

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 848**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2016 PCT/EP2016/052697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16128383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2016 E 16709289 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3256858**

54 Título: **Péptido de histona H4 como un biomarcador**

30 Prioridad:

10.02.2015 US 201562114300 P
18.02.2015 EP 15155599

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

VOGELSANG, MARYANN STEPHANIE;
KRASTINS, BRYAN;
INCAMPS, ANNE;
SCHÖNICHEN, ANDRÉ y
ZIERA, TIM

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 800 848 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

Péptido de histona H4 como un biomarcador

5 Antecedentes

La presente descripción se refiere a los ensayos para la detección de proteínas histona libre y al diagnóstico de enfermedades o afecciones médicas tales como inflamación sistémica basado en la detección de proteínas histona libre.

10 Las proteínas histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4 (dos de cada una) forman un octámero, que está envuelto por 165 pares de bases de ADN para formar la subunidad fundamental de la cromatina, el nucleosoma. Cada nucleosoma está conectado a sus vecinos estabilizados por las histonas conectoras H1 y H5 (Felsenfeld G., Groudine M., Nature 2003; 421 (6921): p. 448-53).

15 Todas las histonas comparten una estructura común y central compacta: una hélice central rodeada por un motivo de hélice-giro-hélice. Aunque las proteínas histonas están altamente cargadas de forma positiva, su estructura permite interacciones hidrófobas específicas con los miembros vecinos para formar un octámero compacto. Las regiones fuera de la estructura central descrita anteriormente no están estructuradas y contienen lados de interacción con ácidos nucleicos, importantes para la formación del nucleosoma. Estas regiones también están sujetas a una variedad de modificaciones postraduccionales (PTM), generalmente acetilación, citrulinación, metilación y fosforilación N-terminales, así como ubiquitinación C-terminal. Las PTM son esenciales para aflojar las estructuras de nucleosomas y, por lo tanto, desempeñan un papel crucial en los diversos procesos celulares, tales como la transcripción génica, la reparación del daño del ADN, la apoptosis, así como la regulación del ciclo celular (Kouzarides T., Cell 2007; 128(4): p. 693-705).

20 Las proteínas histonas también se detectan fuera del núcleo en múltiples procesos pato-fisiológicos (documento WO 2009/061918). La presencia de las histonas extracelulares se ha descrito en la sangre de pacientes que padecen diferentes etiologías que implican procesos inflamatorios, tales como artritis, traumatismos graves, pancreatitis y sepsis. La liberación de histonas de las células inmunes activadas puede estar mediada por trampas extracelulares. Los neutrófilos activados, como un mecanismo final para controlar y eliminar una infección, pueden liberar fibras extracelulares, llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (Brinkmann V., y otros Science 2004; 303(5663): p. 1532-5). Otros mecanismos por los cuales las histonas pueden liberarse en el torrente sanguíneo de un paciente incluyen apoptosis, necrosis, piroptosis o necroptosis de las células.

35 Una vez que las proteínas histonas se liberan en el espacio extracelular y entran en la circulación, despliegan su potencial proinflamatorio y tóxico (Xu J., y otros Nat Med 2009; 15: 1318-1321; Abrams ST., y otros, J Immunol 2013; 191(5): 2495-502). Varios estudios han revelado que las proteínas histonas circulantes no solo tienen propiedades antimicrobianas, sino que también juegan un papel patológico en las enfermedades inflamatorias e infecciosas, lesiones asociadas a traumas, afecciones caracterizadas por inflamación estéril, daño de órganos, enfermedades autoinmunes, cáncer y desprendimiento de retina (documento WO 2009/062948, US 8,716,218, Miller B.F., y otros Science 1942; 96(2497): p. 428-430.; Hirsch, J.G. J Exp Med 1958; 108(6): p. 925-44.; Allam R., y otros J Mol Med 2014; 92: 465-472.; Xu J., y otros Nat Med 2009; 15: 1318-1321; Abrams ST., y otros, J Immunol 2013; 191(5): 2495-502; Huang H., y otros Hepatology 2011; 54: 999-1008.; Kang R., y otros Gastroenterology 2014; 146: 1097-1107.; Wen Z., y otros J Cell Biochem 2013; 114: 2384-2391.; Xu J., y otros, J Immunol 2011; 187: 2626-2631.; De Meyer SF., y otros Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012; 32: 1884-1891.; Barrera CA., y otros Am J Respir Crit Care Med 2013; 188: 673-683; Allam R., y otros J Am Soc Nephrol 2012; 23: 1375-1388; Bosmann M., y otros, Faseb J 2013; 27: 5010-5021; Allam R., y otros, Eur J Immunol 2013; 43: 3336-3342; Kawano H., y otros Lab Invest 2014; 94: 569-585; Monach PA., y otros, Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 15867-15872; Hakkim A., y otros, Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 9813-9818; Kessenbrock K., y otros, Nat Med 2009; 15: 623-625; Holdenrieder S., y otros, Int J Cancer 2001; 95: 114-120).

40 Las proteínas histonas podrían servir como biomarcadores para el reconocimiento y/o deterioro temprano de la enfermedad, así como una diana terapéutica potencial (Chen R., y otros, Cell Death and Disease 2014; 5: e1370; Xu J., y otros, Nat Med 2009; 15: 1318-1321). Por ejemplo, Michael Liembo Ekaney y otros, describe el impacto de las histonas plasmáticas en la sepsis humana y su contribución al daño celular y la inflamación (Michael Liembo Ekaney y otros, Critical Care, Biomed Central LTD., Londres, Reino Unido, vol. 18, no. 5, 24.9.2014). Además, el documento US 2014/294843 A1 describe un método para diagnosticar y/o detectar la EPOC basado en la detección de una o más proteínas histonas, por ejemplo, la proteína histona H2B, H3, H3.3 o H4.

50 La falta de herramientas de cuantificación fiables y disponibles de las histonas que circulan libremente dificulta la evaluación de la utilidad clínica de estos biomarcadores potenciales. Las histonas circulantes en una muestra derivada de sangre de pacientes se han medido solo indirectamente mediante el análisis de Western Blot o mediante la determinación de los niveles de nucleosomas (octámero de histonas en asociación con ADN - complejo proteína ADN) mediante el uso de inmunoensayos ligados a enzimas (Zeerleder S., y otros, Crit Care Med 2003; 31(7): p. 1947-51; Kutcher M.E., y otros, J Trauma Acute Care Surg 2012; 73(6): p. 1389-94; Zeerleder S., Crit Care 2006; 10(3): p. 142;

documento WO 2009061918). El uso del análisis de Western Blot en la rutina clínica es altamente cuestionable, debido al alto costo, la demanda técnica compleja y el largo tiempo para obtener resultados. Además, requiere de múltiples etapas y, por lo tanto, es propenso a producir resultados subjetivos. Los niveles de nucleosomas también se han detectado en procesos patológicos. Aunque las proteínas histonas reflejan una parte fundamental del nucleosoma, los nucleosomas intactos no son tóxicos (Abrams ST., y otros, *Am J Resp Crit Care Med* 2013; 187: 160-169). Los ensayos de nucleosomas detectan las proteínas histonas en complejo con ADN. Por lo tanto, la detección de nucleosomas no proporciona información sobre la cantidad de histonas que circulan libremente o sus fragmentos.

Las proteínas histonas modificadas después de la traducción se pueden detectar mediante técnicas de espectrometría de masas (Sidoli S., y otros *J Proteomics* 2012; 75(12): 3419-3433; Villar-Garea A., y otros *Curr Protoc Protein Sci* 2008; Capítulo 14: Unidad 14 10). La detección de las proteínas histonas en exosomas mediante el uso de la tecnología de espectrometría de masas (MS) también se ha mostrado para muestras altamente purificadas de cultivos de tejidos cultivados *in vitro* (Buschow S.I., y otros, *Immunol Cell Biol* 2010; 88(8): p. 851-6) o por previa electroforesis en gel (Xu J., y otros, *Nat Med* 2009; 15: 1318-1321).

Se ha informado que la medición cuantitativa de las proteínas histonas mediante el uso de MS en muestras de plasma de pacientes nativos no tuvo éxito debido a las proteínas del plasma con alta abundancia, que interfirieron con la detección de las proteínas histonas. Además, incluso la depleción de la proteína de mayor abundancia no mejoró la detectabilidad de las histonas en las muestras de plasma de los pacientes (Ekaney M., y otros, *Crit Care* 2014; 18(5): p. 543).

Para las mediciones de espectrometría de masas, la derivatización química generalmente se realiza antes de analizar y cuantificar la proteína diana (Yuan Z.F., y otros, *Annu Rev Anal Chem* (Palo Alto Calif) 2014; 7: 113-128, García B.A., y otros, *Nat Protoc* 2007; 2(4): 933-938. , documento WO 2013/148178). No obstante, todavía no se ha descrito ningún método de cuantificación en fluidos biológicos sin ninguna modificación química o marcaje.

Varios biomarcadores para la diferenciación de SIRS y sepsis se han descrito en la técnica anterior (documento WO 2009/062948).

Resumen

La invención se refiere a las modalidades como se definen en las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a un método para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos y/o control de terapia de una enfermedad o afección médica, que comprende detectar una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma en una muestra biológica de un sujeto, en donde la presencia de dicha proteína histona libre o el fragmento de la misma es indicativa de dicha enfermedad o afección médica, en donde la proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La presente descripción se refiere a métodos de detección sensibles para la medición cuantitativa de las proteínas histonas extracelulares en muestras biológicas tales como muestras derivadas de la sangre. Los métodos de detección descritos en el presente documento pueden dirigirse a las proteínas histonas circulantes libres que no son parte de un complejo macromolecular tal como un nucleosoma o una trampa extracelular de neutrófilos (NET). El método no requiere ninguna reducción de la complejidad de la mezcla de proteínas en la muestra, por ejemplo, mediante la captura inicial de la proteína histona a través de inmunoprecipitación o aislamiento por electroforesis en gel. Mediante el análisis de la muestra "nativa", el método de la invención evita una eliminación accidental de las proteínas histonas y de los péptidos derivados de histonas unidos a proteínas no diana, por ejemplo, albúmina. Por lo tanto, los métodos descritos permiten una cuantificación precisa y estandarizada de las proteínas histonas mediante la detección de péptidos derivados de histonas en la mezcla nativa compleja del proteoma sérico y plasmático. Además, el método puede aplicarse para la evaluación clínica de pacientes (enfermos críticos). La presente invención se refiere a un método que detecta, por ejemplo, un epítipo o un fragmento peptídico de dicha proteína histona que no es accesible cuando la proteína histona se ensambla en un nucleosoma. Además, o alternativamente, el epítipo o fragmento peptídico de dicha proteína histona a detectar puede o no tener una modificación postraducciona, preferentemente el epítipo o fragmento peptídico de dicha proteína histona a detectar no tiene una modificación postraducciona.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos y/o control de terapia de una enfermedad o afección médica. En los ejemplos adjuntos, se demuestra que los ensayos basados en inmunoensayo y espectrometría de masas de la invención detectan las histonas libres en muestras de sujetos que padecen una enfermedad o afección médica; véanse las Figuras 1, 2 y 8 ilustrativas.

La detección de la proteína histona libre o un fragmento de la misma se puede realizar utilizando cualquier método adecuado, tal como inmunoensayos o métodos basados en espectrometría de masas (MS).

En particular, la presente invención proporciona un método de inmunoensayo para la detección de las proteínas histona libre utilizando los métodos de la invención, que comprende las etapas de: a) poner en contacto la muestra

con un primer anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un epítipo de la proteína histona libre y un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un epítipo de la proteína histona libre, y b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la proteína histona libre.

La invención también se refiere a métodos basados en espectrometría de masas (MS) para la detección de las proteínas histona libre, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La descripción se refiere además a los anticuerpos y los kits y al uso de los mismos en los métodos de la invención.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Resultado típico de la determinación de las concentraciones de la histona H4 en muestras de suero de voluntarios sanos y muestras de pacientes con resultado positivo para PCT usando un inmunoensayo.

Figura 2: Comparación de los inmunoensayos H4-LI-9-ab31830 (V1) versus H4-RR-13-ab31830 (V2) que detectan la histona H4 en las muestras.

Figura 3: Correlación de los inmunoensayos H4-LI-9-ab31830 (V1) versus H4-RR-13-ab31830 (V2) que detectan la histona H4 en las muestras.

Figura 4: Inmunoensayos de la curva de respuesta a la dosis H4-LI-9-ab31830 (V1) versus H4-RR-13-ab31830 (V2) que detectan la histona H4 en suero cero.

Figura 5: Correlación entre SRM e inmunoensayo.

Figura 6: Concentración de nucleosomas determinada con el ELISA de detección de muerte celular de la Roche (#11544675001) usando las mismas muestras que en la Figura 1.

Figura 7: Comparación entre el inmunoensayo tipo sándwich y el ensayo SRM de la presente invención y el ELISA de detección de muerte celular de la Roche disponible comercialmente (#11544675001) que muestra que se detectan las proteínas histona libre, pero no nucleosomas.

Figura 8: Resultado de las concentraciones de la histona H4 determinadas en muestras de suero de voluntarios sanos y muestras de pacientes que padecen sepsis por medición SRM del péptido VFLENVIR (SEQ ID NO: 4).

Figura 9: Perfil de SRM (software Skyline) para el péptido de la histona H4 VFLENVIR (SEQ ID NO: 4) en una muestra de suero de un paciente que padece sepsis. El gráfico superior representa 4 transiciones del péptido endógeno. El gráfico inferior representa las 4 transiciones correspondientes del péptido altamente pesado.

Figura 10: Curva de calibración del péptido VFLENVIR (SEQ ID NO: 4) de la histona H4. La cantidad constante de péptido ligero obtenida de la digestión de la H4 recombinante, y la cantidad variable del péptido pesado correspondiente se introducen para crear un conjunto de estándares de concentración.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere a un método para detectar una proteína histona libre en una muestra biológica de un sujeto. El método se basa en la detección de un epítipo o de un fragmento peptídico de dicha proteína histona.

La presente descripción también se refiere a un método para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos y/o control de terapia de una enfermedad o afección médica, que comprende detectar una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma en una muestra biológica de un sujeto, en donde la presencia de dicha proteína histona libre o el fragmento de la misma es indicativa de dicha enfermedad o afección médica.

Tal y como se usan en el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Se puede hacer referencia a los aminoácidos en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

Las proteínas histonas a detectar en cualquiera de los métodos de la invención engloban histonas canónicas, así como isoformas/variantes de las mismas. Preferentemente, la proteína histona libre o el fragmento peptídico de la misma a detectar se selecciona del grupo que consiste en H1, H2A, H2B, H3, H4 e isoformas de las mismas, más preferentemente H2A o H4. Aún más preferente, se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 20 a 55 o 70 a 118 de la histona H2A de acuerdo con la SEQ ID NO: 23 o un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102, más preferentemente 46 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Las variantes de histonas tal y como se usa en el presente documento son variantes canónicas o convencionales de las histonas. Las histonas no canónicas (no alélicas) - que tienen uno o unos pocos (hasta 2, 4, 6 u 8) intercambios de aminoácidos - se expresan a niveles muy bajos en comparación con sus contrapartes convencionales. Las variantes de las histonas tienen patrones específicos de expresión, localización y distribución de especies, y confieren las propiedades estructurales y funcionales novedosas en el nucleosoma, lo que afecta la remodelación de la cromatina y las modificaciones postraduccionales de las histonas. Entre las histonas centrales, H2A tiene el mayor número de variantes, incluyendo H2A.Z, MacroH2A, H2A-Bbd, H2AvD y H2A.X, mientras que la histona H4 es una de las proteínas de evolución más lenta, y no parece haber variantes de secuencia conocida de la histona H4.

Las "proteínas histona libre" o "histonas libres" en el contexto de la invención engloban proteínas histonas que no se ensamblan en un complejo macromolecular tal como un nucleosoma o una trampa extracelular de neutrófilos (NET). De acuerdo con esto, las histonas libres en el contexto de la invención se caracterizan porque las regiones de dichas histonas pueden detectarse empleando métodos de la invención, que no son accesibles en un complejo macromolecular estequiométrico ensamblado, como un mononucleosoma o un octámero. En este contexto, "estequiométrico" se refiere a complejos intactos, por ejemplo, un mononucleosoma o un octámero. Las "NET" son trampas extracelulares de neutrófilos (Brinkmann V., y otros Science 303(5663): p. 1532-5, 2004). La parte central de las NET se constituye a partir de la cromatina liberada por los neutrófilos suicidas y toma la forma de hilos y cables basados en el ADN. Además del ADN, algunas proteínas, tales como las histonas, forman dominios globulares en estas NET. Los microorganismos son destruidos por los cultivos de neutrófilos que han sido estimulados para producir las NET. Las "proteínas de histona libre" también comprenden histonas no unidas a cromatina. Las "proteínas histona libre" también pueden comprender proteínas histonas individuales o complejos de histonas no octaméricos enredados en las NET. Las proteínas histona libre se denominan proteínas histonas monoméricas, heterodiméricas o tetraméricas, que no se ensamblan en un complejo nucleosómico ("estequiométrico") que consiste en el octámero de histonas unido al ácido nucleico. Por lo tanto, las histonas libres se definen como histonas individuales presentes solo en forma de monómeros y/u homo y heterodímeros y/u homo y heterotetrámeros, mientras que las histonas unidas se definen como histonas incorporadas en el núcleo octamérico de los nucleosomas, que consiste en dos moléculas de cada una de H2A, H2B, H3 y H4 que interactúan a través de interacciones hidrófobas. En último caso, las regiones centrales de las histonas están cubiertas y son estéricamente inaccesibles ya que estas regiones participan en interacciones intramoleculares entre las moléculas de histonas individuales.

Las histonas libres pueden unirse transitoriamente a las histonas individuales, por ejemplo, las histonas pueden formar homodímeros o H3 y H4, o H2A y H2B pueden formar un heterodímero. Las histonas libres de acuerdo con la invención también pueden formar homo o heterotetrámeros. El homo o heterotetrámero consiste en cuatro moléculas de histonas, por ejemplo, H2A, H2B, H3 y/o H4. Un heterotetrámero típico está formado por dos heterodímeros, en donde cada heterodímero consiste en H3 y H4. También se entiende en el presente documento que, un heterotetrámero puede estar formado por H2A y H2B. También se prevé en el presente documento que, un heterotetrámero puede estar formado por un heterodímero que consiste en H3 y H4, y un heterodímero que consiste en H2A y H2B. Se entiende en el presente documento que las histonas libres pueden ser variantes de histonas o pueden encontrarse asociadas con variantes de histonas. En ciertos aspectos de la invención, las histonas libres, por ejemplo, un monómero, dímero o tetrámero de la o las histonas, están asociadas con ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN. Por consiguiente, los anticuerpos y los métodos de la invención pueden detectar histonas libres independientemente de los ácidos nucleicos asociados.

Como se mencionó anteriormente, se entiende en el presente documento que las histonas libres no son parte del octámero relacionado con el nucleosoma. El octámero es la partícula central proteica de los nucleosomas que consiste en dos dímeros de H2A y H2B y un tetrámero de H3 y H4. El Ejemplo 4 documenta que el método basado en inmunoensayo y los anticuerpos utilizados del mismo no detectan las histonas, por ejemplo, H4, cuando forman parte del núcleo octamérico de los nucleosomas. De manera similar, los péptidos detectados por métodos basados en espectrometría de masas de acuerdo con la invención, por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 y 4, se originan a partir de histonas libres. Estos péptidos detectados son partes de la proteína histona que estarían ocultos y, por lo tanto, serían inaccesibles para, por ejemplo, proteasas cuando las histonas son parte del octámero; véanse, por ejemplo, Ejemplo 3 y 7.

Además, las histonas libres pueden interactuar transitoriamente con las proteínas plasmáticas de gran abundancia incluyendo albúmina, amiloide A sérico, proteína inhibidora inter-alfa, receptores tipo toll, pentraxinas tales como amiloide P sérico y la proteína C reactiva dirigidas principalmente por interacciones iónicas de los residuos cargados positivamente en el extremo N de las histonas. Por lo tanto, las histonas libres cuando se unen a las proteínas plasmáticas todavía son accesibles para los anticuerpos dirigidos contra las regiones centrales y el extremo C.

Como se demuestra en los ejemplos adjuntos, en el presente documento se proporcionan ensayos, kits y anticuerpos para detectar histonas libres. Por ejemplo, las histonas libres se detectan a través de regiones de las histonas, por ejemplo, H2A y H4, que esencialmente no son accesibles en un complejo macromolecular estequiométrico tal como un octámero; véanse, por ejemplo, los Ejemplos 3 y 4. Se entiende en el presente documento que una región de la histona es una cadena de polipéptido que es accesible en una histona libre, pero es esencialmente inaccesible en el caso en el que las histonas estén en complejos macromoleculares tales como un octámero. En los ejemplos adjuntos, se demuestra que los métodos, por ejemplo, inmunoensayos, así como los ensayos basados en espectrometría de masas, son adecuados para la detección de histonas libres. En particular, se muestra en el presente documento que los anticuerpos ejemplares empleados en el método basado en inmunoensayo son específicos para las histonas libres.

Por consiguiente, los anticuerpos de la descripción tienen una mayor afinidad de unión a las histonas libres en comparación con las histonas unidas que se encuentran, por ejemplo, en el octámero o nucleosoma. En los ejemplos adjuntos se muestra que dichos anticuerpos ejemplares se unen a regiones de las histonas, que solo son accesibles en las histonas libres. En particular, se demuestra en el Ejemplo 4 que los métodos basados en inmunoensayo de acuerdo con la invención y los anticuerpos empleados en el mismo detectan la histona libre, por ejemplo, H4, pero no detectan dicha histona cuando es parte del núcleo octamérico.

Las histonas libres también se pueden detectar empleando métodos de espectrometría de masas. Como se muestra para el método basado en inmunoensayo, los péptidos pueden detectarse mediante espectrometría de masas, que son productos de escisión de las histonas libres; véase, por ejemplo, el Ejemplo ilustrativo 4. En otras palabras, estos péptidos se generan a partir de histonas libres. Sin estar obligados por la teoría, la o las proteasas que pueden usarse en ciertos aspectos de la invención para generar una digestión proteolítica en la preparación para el análisis por espectrometría de masas, no es capaz de acceder a los péptidos de la región central cuando las histonas están en un complejo macromolecular tal como un octámero. En otras palabras, la proteasa no puede penetrar en estos sitios de escisión debido al impedimento estérico. Por lo tanto, dicho método detecta péptidos, por ejemplo, péptidos de las regiones centrales, que representan histonas libres.

En los ejemplos adjuntos se demuestra que los ensayos de la presente invención, los kits y los anticuerpos de la presente descripción detectan péptidos o epítomos de histonas libres que son accesibles en las histonas libres. Estas cadenas de aminoácidos también se denominan en el presente documento regiones o partes centrales de las histonas. A continuación, se describen péptidos o epítomos que pueden emplearse para detectar histonas libres usando los métodos proporcionados en el presente documento. Un péptido o epítomo ejemplar que puede emplearse para detectar la proteína histona libre mediante los métodos proporcionados en el presente documento es un epítomo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o 20 a 118 de la histona H2A de acuerdo con la SEQ ID NO: 23. Además, un péptido o epítomo ejemplar que puede emplearse para detectar la proteína histona libre mediante los métodos proporcionados en el presente documento puede ser un epítomo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 27 a 62 de la histona H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 36, o 41 a 69 de la histona H2B de acuerdo con la SEQ ID NO: 31. Más preferentemente, la histona H4 libre se detecta por el o los péptidos o el o los epítomos seleccionados del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca los residuos 22 a 30 de la SEQ ID NO: 1, residuos 67 a 78 de la SEQ ID NO: 1, residuos 92 a 102 de la SEQ ID NO: 1, residuos 22 a 34 de la SEQ ID NO: 1, residuos 46 a 102 de la SEQ ID NO: 1, residuos 46 a 55 de la SEQ ID NO: 1, residuos 60 a 67 de la SEQ ID NO: 1, residuos 80 a 91 de la SEQ ID NO: 1, residuos 24 a 35 de la SEQ ID NO: 1, y residuos 68 a 77 de la SEQ ID NO: 1. La histona H2A libre se detecta preferentemente por el o los péptidos o el o los epítomos seleccionados del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca los residuos 21 a 53 de la SEQ ID NO: 23, residuos 21 a 29 de la SEQ ID NO: 23, residuos 30 a 53 de la SEQ ID NO: 23, residuos 120 a 129 de la SEQ ID NO: 23, residuos 21 a 29 de la SEQ ID NO: 23, residuos 82 a 88 de la SEQ ID NO: 23, residuos 89 a 95 de la SEQ ID NO: 23, y residuos 100 a 118 de la SEQ ID NO: 23.

La histona H2B libre se detecta preferentemente por el péptido o el epítomo que abarca los residuos 41 a 69 de la SEQ ID NO: 31.

La histona H3 libre se detecta preferentemente por el o los péptidos o el o los epítomos que abarcan los residuos 27 a 37 de la SEQ ID NO: 36 y/o que abarcan los residuos 52 a 62 de la SEQ ID NO: 36.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "cromatina" se refiere a la estructura de la nucleoproteína que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende al ácido nucleico, principalmente ADN y proteína, incluyendo histonas y proteínas cromosómicas no histonas. La mayoría de la cromatina celular eucariota existe en forma de nucleosomas, en donde un núcleo de nucleosomas comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociado con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y el ADN conector (de longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre los núcleos de nucleosomas. Una molécula de histona H1 generalmente se asocia con el ADN conector. Un "cromosoma" es un complejo de cromatina que comprende todo o una parte del genoma de una célula.

En el presente documento, el término "nucleosoma" o "complejo de nucleosomas" significa la unidad fundamental de la cromatina que está compuesta por un octámero de las cuatro histonas centrales H3, H4, H2A y H2B alrededor del cual se envuelven aproximadamente 150 pares de bases de ADN.

El epítomo detectado puede ser preferentemente un epítomo que no es accesible cuando la histona se ensambla en un nucleosoma. Como se describió anteriormente, "no accesible" en el contexto de la invención significa que el epítomo no puede unirse específicamente por un ligando, particularmente por un anticuerpo, cuando la histona es parte de un complejo de nucleosomas. También se incluyen epítomos que no son estructuralmente accesibles debido a impedimentos estéricos cuando la histona es parte del complejo de nucleosomas.

El término "fragmento" en el contexto de la invención se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que se derivan de proteínas o péptidos más grandes, que, por lo tanto, comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido más grande. Dichos fragmentos se derivan de las proteínas o péptidos más grandes por hidrólisis de uno o más de sus enlaces peptídicos. Los fragmentos tienen preferentemente al menos 6, 9, 10 o 12 residuos.

En el presente documento, el término "muestra" es una muestra biológica. "Muestra", tal y como se usa en el presente documento puede referirse, por ejemplo, a una muestra de fluido o tejido corporal obtenido para el propósito de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente.

Preferentemente, en el presente documento, la muestra es una muestra de un fluido o un tejido corporal del sujeto. Es preferente una muestra de fluido corporal. Las muestras de ensayo preferentes incluyen sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones pleurales. Además, un experto en la técnica se daría cuenta de que algunas muestras de ensayo se analizarían más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

Por lo tanto, la muestra usada en la presente invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de fluido cerebroespinal, una muestra de saliva, una muestra de orina, una muestra de tejido o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente.

Preferentemente, la muestra es una muestra de sangre, lo más preferentemente una muestra de suero o una muestra de plasma. Las muestras de suero son las muestras de mayor preferencia en el contexto de la presente invención.

Cuando sea apropiado, la muestra puede homogeneizarse o extraerse con un disolvente antes de su uso en la presente invención con el fin de obtener una muestra líquida. Una muestra líquida puede ser una disolución o suspensión. Las muestras líquidas pueden someterse a uno o más pretratamientos antes de su uso en la presente invención. Estos pretratamientos incluyen, pero no se limitan a, dilución, filtración, centrifugación, concentración, sedimentación, precipitación o diálisis. Los pretratamientos también pueden incluir la adición de sustancias químicas o bioquímicas a la disolución, tales como ácidos, bases, tampones, sales, disolventes, colorantes reactivos, detergentes, emulsionantes, quelantes.

"Plasma" en el contexto de la presente invención es el sobrenadante prácticamente libre de células de la sangre que contiene anticoagulante obtenido después de la centrifugación. Los anticoagulantes ejemplares incluyen compuestos de unión a iones de calcio tales como EDTA o citrato e inhibidores de trombina tales como heparinatos o hirudina. El plasma libre de células puede obtenerse por centrifugación de la sangre anticoagulada (por ejemplo, sangre citrada, con EDTA o heparinizada), por ejemplo, durante al menos 15 minutos a 2000 a 3000 g.

"Suero" en el contexto de la presente invención es la fracción líquida de la sangre completa que se recoge después de que se deja coagular la sangre. Cuando la sangre se coagula (sangre coagulada) se centrifuga, se puede obtener suero como sobrenadante.

Los términos "paciente", "individuo" y "sujeto" pueden usarse indistintamente a lo largo de la presente invención. Un "paciente", "individuo" o "sujeto" para los propósitos de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, particularmente mamíferos y otros organismos. Por lo tanto, los métodos son aplicables tanto a diagnósticos humanos como a aplicaciones veterinarias. En una modalidad preferente, el paciente es un mamífero, y en la modalidad con mayor preferencia, el paciente o sujeto es un ser humano. El término "paciente", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo humano o no humano vivo que no está recibiendo atención médica o que está recibiendo atención médica o que debería recibir atención médica debido a una enfermedad o afección médica, particularmente inflamación sistémica. Esto incluye a personas con enfermedad indefinida que están siendo investigadas para determinar los signos de la patología. Por lo tanto, los métodos y ensayos descritos en el presente documento se aplican tanto a enfermedades humanas como veterinarias.

El término "epítipo", también conocido como determinante antigénico, usado en el presente documento se refiere a la parte de un antígeno que es reconocida por anticuerpos, células B o células T. Por consiguiente, "epítipo" significa una porción de una molécula a la que se une un anticuerpo, por ejemplo, una cadena de polipéptido. Tanto los epítipos conformacionales como los epítipos lineales están abarcados por el término "epítipo".

En el contexto de la presente invención, la proteína histona libre o el fragmento peptídico de la misma detectado en un método de la presente invención puede verse como un biomarcador. El término "biomarcador" (marcador biológico) se refiere a parámetros biológicos mensurables y cuantificables (por ejemplo, concentración enzimática específica, concentración hormonal específica, distribución del fenotipo del gen específico en una población, presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para evaluaciones relacionadas con la salud y la fisiología, tales como riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición ambiental y sus efectos, diagnóstico de enfermedades, procesos metabólicos, abuso de sustancias, embarazo, desarrollo de líneas celulares, estudios epidemiológicos, etcétera. Además, un biomarcador se define como una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Un biomarcador se puede medir en una muestra biológica (como un análisis de sangre, orina o tejido), puede ser un registro obtenido de una persona (presión arterial, ECG o Holter). Los biomarcadores pueden indicar una variedad de características de salud o enfermedad, incluyendo el nivel o tipo de exposición a un factor ambiental, susceptibilidad genética, respuestas genéticas a exposiciones, biomarcadores de enfermedad subclínica o clínica, o

indicadores de la respuesta a la terapia. Por lo tanto, una forma simplista de pensar en los biomarcadores es como indicadores del rasgo de la enfermedad (factor de riesgo o biomarcador de riesgo), estado de la enfermedad (preclínica o clínica) o tasa de la enfermedad (progresión). Por consiguiente, los biomarcadores se pueden clasificar como biomarcadores antecedentes (que identifican el riesgo de desarrollar una enfermedad), biomarcadores de cribado (cribado de enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (que reconocen la enfermedad manifiesta), biomarcadores de estadificación (que clasifican la gravedad de la enfermedad) o biomarcadores de pronóstico (predicción del curso futuro de la enfermedad, incluyendo la recurrencia y la respuesta a la terapia, y la monitorización de la eficacia de la terapia). Los biomarcadores también pueden servir como puntos finales sustitutos. Un punto final sustituto es aquel que se puede usar como un resultado en ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la efectividad de las terapias en lugar de la medición del verdadero resultado de interés. El principio subyacente es que las alteraciones en el punto final sustituto siguen de cerca los cambios en el resultado de interés. Los puntos finales sustitutos tienen la ventaja de que pueden recolectarse en un marco de tiempo más corto y con menos gastos que los puntos finales tales como la morbilidad y la mortalidad, que requieren grandes ensayos clínicos para su evaluación. Los valores adicionales de los puntos finales sustitutos incluyen el hecho de que están más cerca de la exposición/intervención de interés y pueden ser más fáciles de relacionar causalmente que los eventos clínicos más distantes. Una desventaja importante de los puntos finales sustitutos es que si el resultado clínico de interés está influenciado por numerosos factores (además del punto final sustituto), la confusión residual puede reducir la validez del punto final sustituto. Se ha sugerido que la validez de un punto final sustituto es mayor si puede explicar al menos el 50 % del efecto de una exposición o intervención en el resultado de interés. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una proteína, péptido o una molécula de ácido nucleico. Las proteínas histona libre pueden usarse en el contexto de la presente invención junto con otros biomarcadores, es decir, las proteínas histona libre pueden ser parte de un panel de biomarcadores.

"Diagnóstico" en el contexto de la presente invención se refiere al reconocimiento y la detección (temprana) de una enfermedad o afección clínica en un sujeto y también puede comprender un diagnóstico diferencial. Además, la evaluación de la gravedad de una enfermedad o afección clínica puede abarcar, en ciertas modalidades, por el término "diagnóstico".

"Pronóstico" se refiere a la predicción de un resultado o un riesgo específico para un sujeto que padece una enfermedad o afección clínica particular. Esto puede incluir una estimación de la posibilidad de recuperación o la posibilidad de un resultado adverso para dicho sujeto.

Los métodos de la invención también pueden usarse para la monitorización. La "monitorización" se relaciona con el seguimiento de una enfermedad, trastorno, complicación o riesgo ya diagnosticado, por ejemplo, para analizar la progresión de la enfermedad o la influencia de un tratamiento particular en la progresión de la enfermedad o trastorno.

El término "control de la terapia" en el contexto de la presente invención se refiere a la monitorización y/o ajuste de un tratamiento terapéutico de dicho paciente.

En la presente invención, los términos "evaluación de riesgos" y "estratificación de riesgos" se refieren a la agrupación de sujetos en diferentes grupos de riesgo de acuerdo con su pronóstico adicional. La evaluación de riesgos también se relaciona con la estratificación para aplicar medidas preventivas y/o terapéuticas.

Además, o alternativamente, en los métodos de la invención, el epítipo o el fragmento peptídico de dicha proteína histona libre a detectar no tiene una modificación postraducciona.

El término "modificaciones postraduccionales" o "PTM" en el contexto de la presente invención se refiere a modificaciones que ocurren en una proteína, catalizadas por enzimas, después de que su traducción por los ribosomas es completa. La modificación postraducciona generalmente se refiere a la adición de un grupo funcional covalentemente a una proteína. Preferentemente, las "modificaciones postraduccionales" de histonas en el contexto de la invención son modificaciones, que se introducen, por ejemplo, por acetiltransferasas, lisina metiltransferasas y lisina desmetilasas. Preferentemente, una modificación postraducciona en el contexto de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en acetilación, citrilación, desacetilación, metilación, desmetilación, desiminación, isomerización, fosforilación y ubiquitinación.

En el contexto de los métodos de diagnóstico, pronóstico y evaluación de riesgos de la presente invención, se puede analizar adicionalmente al menos un parámetro clínico, por medio del cual los parámetros clínicos se seleccionan del grupo que comprende: temperatura corporal, presión arterial, frecuencia cardíaca, valor de leucocitos.

En el contexto de los métodos de diagnóstico, pronóstico y evaluación de riesgos de la presente invención, se puede analizar adicionalmente al menos un biomarcador, por medio del cual el biomarcador se selecciona del grupo que comprende: calcitonina, adrenomedulina (ADM/proADM), endotelina-1 (ET-1), arginina vasopresina (AVP), péptido natriurético auricular (ANP), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), troponina, péptido natriurético cerebral (BNP), proteína C reactiva (CRP), proteína de cálculos pancreáticos (PSP), receptor de activación expresado en células mieloides 1 (TREM1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-20 (IL-20), interleuquina-22 (IL-22), interleuquina-24 (IL-24) otras IL, presepsina, proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP), alfa-1-antitripsina, metaloproteínasa de

matriz 2 (MMP2), metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) y factor de necrosis tumoral α (TNF α). Preferentemente, al menos un biomarcador seleccionado del grupo que comprende: procalcitonina (PCT), adrenomedulina (ADM/proADM), presepsina (SCD14-ST) y proteína C reactiva (CRP).

5 La enfermedad o afección médica de cualquiera de los métodos de la invención puede seleccionarse de enfermedades o afecciones médicas que implican la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de un individuo relacionada con etiologías infecciosas y no infecciosas tales como sepsis, sepsis grave y choque séptico causado por estímulos microbianos, es decir, bacterias, virus, hongos y/o parásitos, lesiones traumáticas y/o hemorragia, lesiones por isquemia-reperfusión, lesiones por quemaduras, pancreatitis aguda, así como procedimientos de intervención tales como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar, quimioterapia y radioterapia cuando un individuo está en riesgo de desarrollar daño del tejido endotelial, tromboembolismo y coagulación intravascular diseminada (DIC) aguda, lo que contribuye a la disfunción y fallo de uno o múltiples órganos (en particular, lesión renal aguda, lesión pulmonar aguda y lesión hepática) durante el curso de la enfermedad.

15 La "inflamación sistémica" en el contexto de la invención se refiere preferentemente a una afección caracterizada por una liberación de citoquinas proinflamatorias y a un sistema inmune innato activado que puede estar causada por factores biológicos, factores químicos o por factores genéticos. La "inflamación sistémica" grave puede conducir al fallo del órgano y la muerte.

20 "SIRS" en el contexto de la invención es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica sin signos de infección. Incluye, pero no está limitado a, más de una de las siguientes manifestaciones clínicas: (1) una temperatura corporal mayor de 38 °C o menor de 36 °C; (2) una frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto; (3) taquipnea, que se manifiesta por una frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto, o hiperventilación, como lo indica una PaCO₂ menor de 32 mm Hg; y (4) una alteración en el recuento de glóbulos blancos, tal como un recuento mayor de 12 000/mm³, un recuento menor de 4000/mm³, o la presencia de más del 10 % de neutrófilos inmaduros (Bone y otros, CHEST 101(6): 1644-55, 1992).

"Sepsis" en el contexto de la invención significa la respuesta sistémica a la infección. Alternativamente, la sepsis puede verse como la combinación de SIRS con un proceso infeccioso confirmado. La sepsis puede caracterizarse como un síndrome clínico definido por la presencia tanto de infección como de una respuesta inflamatoria sistémica (Levy MM y otros 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. Abril de 2003; 31 (4): 1250-6). El término "sepsis" usado en el presente documento incluye, pero no está limitado a, sepsis, sepsis grave, choque séptico. La sepsis grave en este contexto significa sepsis asociada con disfunción orgánica, anomalía de hipoperfusión o hipotensión inducida por sepsis. Las anomalías de hipoperfusión incluyen acidosis láctica, oliguria y alteración aguda del estado mental. La hipotensión inducida por sepsis se define por la presencia de una presión arterial sistólica menor de 90 mm Hg o su reducción en 40 mm Hg o más desde la línea base en ausencia de otras causas de hipotensión (por ejemplo, choque cardiogénico). El choque séptico se define como una sepsis grave con hipotensión inducida por sepsis que persiste a pesar de la reanimación adecuada con fluidos, junto con la presencia de anomalías de hipoperfusión o disfunción orgánica (Bone y otros, CHEST 101(6): 1644-55, 1992). El término "sepsis" usado en el presente documento se refiere a todos los estadios posibles en el desarrollo de la sepsis.

La "infección" mencionada anteriormente dentro del alcance de la invención significa un proceso patológico causado por la invasión de tejido o fluido normalmente estéril por microorganismos patógenos o potencialmente patógenos y se relaciona con infecciones por bacterias, hongos, parásitos y/o virus.

45 "Pancreatitis" en el contexto de la invención puede verse como una inflamación del páncreas que progresa de aguda (aparición repentina; duración <6 meses) a aguda recurrente (>1 episodio de pancreatitis aguda) hasta crónica (duración >6 meses). Dentro del alcance de la invención, pero no se limita, están la pancreatitis familiar, la pancreatitis hereditaria y la pancreatitis esporádica idiopática.

50 El término "politraumatismo" o "multitraumatismo" en el contexto de la invención abarca una afección con dos o más lesiones graves en al menos dos áreas del cuerpo o una afección con una lesión múltiple, es decir, dos o más lesiones graves en un área del cuerpo. El politraumatismo puede ir acompañado de un shock traumático y/o de una hipotensión hemorrágica y de un grave peligro para una o más funciones vitales. Al menos una de cada dos o más lesiones o la suma total de todas las lesiones pone en peligro la vida del sujeto lesionado con politraumatismos (Kroupa J., Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 1990 jul;57(4):347-60). En el contexto de la presente invención, la enfermedad o afección es preferentemente la inflamación sistémica, más preferentemente, sepsis o SIRS.

60 Como se mencionó anteriormente, las proteínas histona libre pueden detectarse usando cualquier método adecuado. Los métodos basados en inmunoensayos y los métodos basados en espectrometría de masas son particularmente preferentes en el contexto de la presente invención y se describirán con más detalle a continuación:

Métodos basados en inmunoensayos

65 La invención se refiere además a un inmunoensayo que utiliza cualquiera de los métodos de la invención. En particular, el método de inmunoensayo comprende las etapas de a) poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo o un

fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un primer epítipo de la proteína histona libre diana y un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un segundo epítipo de la proteína histona libre diana, y b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la proteína histona libre. Un ejemplo de dicho ensayo es un ensayo ELISA tipo sándwich.

En el presente documento, el término "anticuerpo" también comprende fragmentos o derivados de unión a antígeno a menos que se afirme otra cosa.

Alternativamente, en lugar de anticuerpos, el alcance de la presente invención puede englobar otras moléculas de captura o soportes moleculares que reconocen específicamente y/o selectivamente secuencias de histonas, epítopos de histonas y conformaciones estructurales de histonas.

En el presente documento, el término "moléculas de captura" o "soportes moleculares" comprende moléculas que pueden usarse para unir moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, la proteína histona libre), de una muestra. Las moléculas de captura deben, por lo tanto, tener una forma adecuada, tanto espacialmente como en términos de características de la superficie, tales como carga superficial, hidrofobicidad, presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unir específicamente las moléculas diana o las moléculas de interés. Por este medio, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobas o de enlaces de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente o interacciones covalentes entre las moléculas de captura o soporte molecular y las moléculas diana o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura o soportes moleculares se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de PNA, una proteína, un péptido y una glicoproteína. Las moléculas de captura o soportes moleculares incluyen, por ejemplo, aptámeros, DARPins (proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas). Afímeros y similares.

El término "anticuerpo" generalmente comprende anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales preparados por ingeniería genética y anticuerpos policlonales y fragmentos de unión de los mismos, en particular, fragmentos Fc, así como los denominados "anticuerpos de cadena única" (Bird RE et al (1988) Science 242:423-6), quiméricos, humanizados, en particular, anticuerpos injertados con CDR, y diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-8). Los anticuerpos pueden ser tanto de origen natural como de origen no natural. Además, los anticuerpos incluyen anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos de cadena única y fragmentos de los mismos. Los anticuerpos pueden ser humanos o no humanos. Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en los seres humanos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab y Fc. La "porción Fc de un anticuerpo" puede ser un fragmento cristalizante obtenido por digestión con papaína de inmunoglobulina que consiste en la mitad C-terminal de dos cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro y conocida como la "región efectora" de la inmunoglobulina. La "porción Fc de un anticuerpo" también puede significar todo, o sustancialmente todo, de una mitad C-terminal de una cadena pesada. También están comprendidas las proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, la presentación en fagos para unirse específicamente a la molécula de interés contenida en una muestra. En este contexto, los términos "específico" y "unión específica" se refieren a anticuerpos generados frente a la molécula de interés o un fragmento de la misma. Se considera que un anticuerpo es específico, si su afinidad hacia la molécula de interés (aquí: proteínas histona libre) o el fragmento mencionado de la misma es al menos 50 veces mayor, preferentemente 100 veces mayor, con mayor preferencia 1000 veces mayor que hacia otras moléculas comprendidas en una muestra que contiene la molécula de interés. Es bien conocido en la técnica cómo desarrollar y seleccionar anticuerpos con una especificidad dada. En el contexto de la invención, son preferentes los anticuerpos monoclonales.

Como se discutirá en más detalle, más adelante en el presente documento, los anticuerpos (primero y/o segundo) o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales preparados por ingeniería genética.

La unión de los anticuerpos a una proteína histona libre (o un fragmento de la misma) tiene lugar en condiciones adecuadas (es decir, que permiten inmunoreacciones, es decir, la unión de los anticuerpos a una proteína histona libre y la formación de complejos inmunes). El experto en la técnica conoce dichas condiciones y pueden usarse formatos estándar de inmunoensayos, por ejemplo, como se describe a continuación. Dichas condiciones estarán preferentemente bajo temperatura, pH y fuerza iónica fisiológicos y pueden tener lugar en medios tales como, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato (PBS).

En los Ejemplos ilustrativos 1 a 4, se describen métodos basados en anticuerpos e inmunoensayos para detectar histonas libres. Se demuestra en los ejemplos adjuntos que un epítipo para detectar la proteína histona libre puede ser un epítipo presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o 20 a 118 de histona H2A de acuerdo con la SEQ ID NO: 23. Además, un epítipo para detectar la proteína histona libre puede ser un epítipo presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 27 a 62 de la histona H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 36, o 41 a 69 de la histona H2B de acuerdo con la SEQ ID NO: 31.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente invención pueden utilizar preferentemente un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que sea específico para (un) epítipo(s) de una histona H4 libre, en donde el primer epítipo y/o el segundo epítipo son epítipos de la histona H4 presentes en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la SEQ ID NO: 1.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que sea específico para (un) epítipo(s) de una histona H2A libre, en donde el primer epítipo y/o el segundo epítipo son epítipos de la histona H2A presentes en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 21 a 53, 20 a 118 o 120 a 129 de la SEQ ID NO: 23.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que sea específico para (un) epítipo(s) de una histona H3 libre, en donde el primer epítipo y/o el segundo epítipo son epítipos de la histona H3 presentes en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 27 a 63 de la SEQ ID NO: 36.

Más preferentemente, los métodos de inmunoensayos de la presente invención utilizan un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que son específicos para (un) epítipo(s) de una histona H4 libre, en donde el o los epítipos se seleccionan del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca los residuos 22 a 30 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 67 a 78 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 92 a 102 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 22 a 34 de la SEQ ID NO: 1, y los residuos 46 a 102 de la SEQ ID NO: 1.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción utilizan preferentemente un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que son específicos para (un) epítipo(s) de una histona H2A libre, en donde el o los epítipos se seleccionan del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca los residuos 21 a 53 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 21 a 29 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 30 a 53 de la SEQ ID NO: 23, y los residuos 120 a 129 de la SEQ ID NO: 23.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que sea específico para (un) epítipo(s) de una histona H2B libre que abarca los residuos 41 a 69 de la SEQ ID NO: 31.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo y/o un segundo anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que sea específico para (un) epítipo(s) de una histona H3 libre que abarca los residuos 27 a 37 de la SEQ ID NO: 36 y/o que abarca los residuos 52 a 62 de la SEQ ID NO: 36.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción utilizan preferentemente un primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo o el/los fragmento(s) de unión a antígeno o derivado(s) del mismo que sea específico para (un) epítipo(s) de una histona H2A libre presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 21 a 53 y/o 120 a 129 de la secuencia de la histona H2A representada por la SEQ ID NO: 23. En otras palabras, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción preferentemente pueden utilizar un primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que sea específicos para un epítipo de la histona H2A presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 21 a 53 y/o 120 a 129 de la secuencia de la histona H2A representada por la SEQ ID NO: 23.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente invención pueden utilizar un primer anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H4 presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la SEQ ID NO: 1, y un segundo anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona libre H2A, H2B, o preferentemente H3.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H2A presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 21 a 53, 120 a 129, o 20 a 118 de la SEQ ID NO: 23, y un segundo anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona libre H3, H4 o preferentemente H2B.

Además, los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H3 presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 27 a 62 de la SEQ ID NO: 36, y un segundo anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona libre H4, o preferentemente H2A o H2B.

Se entiende en el presente documento que, en el contexto de los métodos de inmunoensayos proporcionados en el

presente documento, se puede cambiar el orden de las etapas de contacto en relación con el "primer" y el "segundo" anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo. Por lo tanto, se entiende en el presente documento que, en primer lugar, se puede poner en contacto el "segundo" anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo con la muestra y posteriormente se puede poner en contacto el "primer" anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo con la muestra. También se entiende en el presente documento que los dos anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos pueden ponerse en contacto con la muestra simultáneamente.

Los métodos de inmunoensayos de la presente descripción pueden utilizar un primer anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H2A presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 21 a 29 de la SEQ ID NO: 23 y/o el segundo anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H2A presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 30 a 53 de la SEQ ID NO: 23.

Los métodos de inmunoensayos de la presente invención preferentemente también pueden utilizar un primer anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H4 presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 30 de la SEQ ID NO: 1 (correspondiente al péptido H4-LI-9, SEQ ID NO: 10) o los residuos 46 a 102 de la SEQ ID NO: 1 (correspondiente a la SEQ ID NO: 2) o los residuos 22 a 34 de la SEQ ID NO: 1 y un segundo anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 46 a 102 de la histona H4 (SEQ ID NO: 1).

Los métodos de inmunoensayos de la presente invención pueden utilizar un primer anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H4 presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 20 a 30 de la SEQ ID NO: 1 o los residuos 67 a 78 de la SEQ ID NO: 1 o los residuos 92 a 102 de la SEQ ID NO: 1 o los residuos 22 a 34 de la SEQ ID NO: 1, preferentemente los residuos 67 a 78 de la SEQ ID NO: 1 y/o el segundo anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H4 presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 46 a 102 de la SEQ ID NO: 1.

Los métodos de detección preferentes comprenden inmunoensayos en varios formatos tales como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), arreglos de lecho basado en luminiscencia, ensayo basado en lechos magnéticos, ensayos de microarreglos de proteínas, formatos de ensayo rápido tales como, por ejemplo, ensayos de tiras inmunocromatográficas.

Los ensayos de la invención pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos competitivos y no competitivos. En una modalidad particularmente preferente, el ensayo está en la forma de un ensayo tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en donde la molécula a detectar y/o cuantificar está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo, un lecho, una superficie de un pocillo u otro contenedor, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, por ejemplo, con un colorante, con un radioisótopo, o un resto reactivo o catalíticamente activo o viceversa. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se mide entonces mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos involucrados con los "ensayos sandwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la técnica (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayo 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C y otros, Curr Opin Chem Biol. 2006 feb;10(1):4-10. PMID: 16376134).

En el contexto de la invención, el ensayo puede comprender dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que ambos están presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en donde un primer componente de marcaje se une a la primera molécula de captura, en donde dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en el apantallamiento o la amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de manera que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos tipo sándwich formados en la disolución que comprende la muestra.

Preferentemente, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o un colorante de quimioluminiscencia, en particular, un colorante del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden el uso de colorantes, que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que comprende FAM (5 o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), Rodamina, Rodamina Verde, Rodamina Roja, Rodamina 110, colorantes BODIPY, como BODIPY TMR, Oregon Green, cumarinas como Umbeliferona, benzimidaz, como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como Texas Red, Yakima Yellow, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes

de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden el uso de colorantes, basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4ª ed., Editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol.15, p. 518-562, que incluye las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferentes son esteres de acridinio. Las proteínas histona libre pueden detectarse, por ejemplo, usando sistemas de inmunoensayo tipo sándwich totalmente automatizados en el instrumento B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS (Thermo Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf/Berlín, Alemania). Este analizador de acceso aleatorio emplea la tecnología sensible de Emisión de Criptato Amplificado resuelta en el Tiempo (TRACE), basada en una transferencia no radiactiva entre dos fluoróforos.

La invención se refiere además a un método en donde uno de los anticuerpos (por ejemplo, el primer anticuerpo) está marcado y el otro anticuerpo (por ejemplo, el segundo anticuerpo) está unido a una fase sólida o puede unirse selectivamente a una fase sólida. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en el contexto de los métodos de la invención es preferente que el primer y el segundo anticuerpo estén presentes dispersos en una mezcla de reacción líquida, y en donde un primer componente de marcaje que es parte de un sistema de marcaje basado en la extinción o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia está unido al primer anticuerpo, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje está unido al segundo anticuerpo de modo que, después de la unión de ambos anticuerpos a una proteína histona (o fragmento(s) de la misma), se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos tipo sándwich resultantes en la disolución de medición.

Como se menciona en el presente documento, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Este ensayo puede estar basado en la unión de un analito a detectar a una o más sondas de captura con una cierta afinidad. Con respecto a la interacción entre los anticuerpos y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferentemente mayor de 10^8 M^{-1} .

La descripción se refiere además a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo como se mencionó anteriormente que es específico para un epítipo de una proteína histona libre o el fragmento de la misma como ya se detalló anteriormente.

Los ejemplos adjuntos documentan anticuerpos ejemplares que se emplean con éxito para detectar histonas libres de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, a un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona libre H4, H2A, H2B y/o H3. Además, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona H4 libre comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de dicha histona H4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Además, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona H4 libre comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 46 a 102 de la histona H4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Más preferentemente, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H4 libre comprendido en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca los residuos 22 a 30 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 67 a 78 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 92 a 102 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 22 a 34 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 46 a 102 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 46 a 55 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 60 a 67 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 80 a 91 de la SEQ ID NO: 1, los residuos 24 a 35 de la SEQ ID NO: 1, y los residuos 68 a 77 de la SEQ ID NO: 1.

Además, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona H2A libre comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 20 a 118 de la histona H2A de acuerdo con la SEQ ID NO: 23.

Más preferentemente, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de una histona H2A libre comprendido en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca los residuos 21 a 53 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 21 a 29 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 30 a 53 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 120 a 129 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 21 a 29 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 82 a 88 de la SEQ ID NO: 23, los residuos 89 a 95 de la SEQ ID NO: 23, y los residuos 100 a 118 de la SEQ ID NO: 23.

Además, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo de una histona H3 libre comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 27 a 62 de la histona H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 36.

Más preferentemente, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H3 libre comprendido en la secuencia que abarca los residuos 27 a 37 de la SEQ ID NO: 36 y/o los residuos 52 a 62 de la SEQ ID NO: 36.

- 5 Además, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H2B libre comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 41 a 69 de la histona H2B de acuerdo con la SEQ ID NO: 31.

10 En el contexto de la descripción es particularmente preferente un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H2A en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 20 a 55 o 70 a 118 de la histona H2A libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 23 o un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo que es específico para un epítipo de la histona H4 presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 46 a 102 de la SEQ ID NO: 1. En otras palabras, en aspectos preferentes de la descripción, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo dado en la SEQ ID NO: 2.

15 La descripción se refiere además a una célula huésped que expresa el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo de la descripción.

20 En el contexto de la invención, el término "células huésped" se refiere a cualquier célula que expresa al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo de la descripción. Por consiguiente, las células procariotas, así como las eucariotas, están en el alcance de la descripción.

25 La descripción también se refiere a un kit que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo de la descripción. Los anticuerpos de la descripción antes mencionados pueden usarse en el kit de la descripción.

30 La descripción también abarca el uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo de la descripción o el uso del kit de la descripción en un método para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos y/o control de la terapia de una enfermedad o una afección médica seleccionada de enfermedades o afecciones médicas que involucran la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de un individuo relacionada con etiologías infecciosas y no infecciosas tales como sepsis, sepsis grave y choque séptico causado por estímulos microbianos, es decir, bacterias, virus, hongos y/o parásitos, lesiones traumáticas y/o hemorragias, lesiones por isquemia-reperfusión, lesiones por quemaduras, pancreatitis aguda, así como procedimientos de intervención tales como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar, quimioterapia y radioterapia, donde un individuo está en riesgo de desarrollar daño del tejido endotelial, tromboembolismo y coagulación intravascular diseminada (DIC) aguda que contribuye a la disfunción y fallo de uno solo o múltiples órganos (en particular, lesión renal aguda, lesión pulmonar aguda y lesión hepática) durante el curso de la enfermedad.

40 Métodos basados en espectrometría de masas

45 De acuerdo con la presente invención, la molécula de histona libre puede detectarse usando métodos de espectrometría de masas (MS). Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos y/o control de la terapia de las enfermedades o afecciones médicas definidas anteriormente, que comprende detectar al menos una proteína histona libre o fragmento peptídico de la misma en una muestra por espectrometría de masas (MS), en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona libre H4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Por consiguiente, la invención se refiere al uso de la MS para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, cribado y monitorización de la terapia de los trastornos o afecciones médicas mencionadas anteriormente en un paciente.

50 La invención también se refiere a un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra biológica, comprendiendo dicho método detectar la presencia o cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona modificados o no modificados en dicha muestra biológica o una digerido de proteínas (por ejemplo, digestión trípica) de dicha muestra y opcionalmente separar la muestra con métodos cromatográficos, y someter la muestra preparada y opcionalmente separada al análisis de MS, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en el análisis de la EM puede utilizarse la Monitorización de la reacción seleccionada (SRM), la Monitorización de la reacción múltiple (MRM) o la espectrometría de masas de Monitorización de la reacción en paralelo (PRM), en particular para determinar las cantidades de al menos un péptido de histona.

60 En un aspecto del método de análisis de MS de la invención, no se requiere separar previamente las proteínas en la muestra antes de la digestión proteolítica. Se puede lograr una detección fiable de las histonas libres y péptidos de las mismas sin métodos de separación que comprenden deslipidación, cromatografía, centrifugación o matrices de afinidad que depletan las proteínas abundantes.

En el presente documento, el término "espectrometría de masas" o "MS" se refiere a una técnica analítica para identificar compuestos por su masa. La MS se refiere a métodos de filtrado, detección y medición de iones en función de su relación de masa a carga, o "m/z". La tecnología "MS" se caracteriza por (1) la ionización de compuestos para generar compuestos cargados y (2) la detección de las relaciones de masa a carga de los compuestos cargados. Los compuestos generalmente son ionizados por un ionizador y detectados por un detector de iones. El ionizador y el detector de iones están incorporados en un espectrómetro de masas. En general, una o más moléculas de interés se ionizan, y los iones se introducen posteriormente en un instrumento espectrográfico de masa donde los iones se separan de acuerdo con sus m/z. Esta separación puede realizarse sobre la base del comportamiento dependiente de m/z de los iones en los campos eléctricos (o una combinación de campos eléctricos y magnéticos), o variaciones de tiempo de vuelo en una región libre de campo de los iones que tienen energías cinéticas dependientes de m/z. Véase, por ejemplo, el documento de patente de EE. UU. Núm. 6,204,500, titulada "Mass Spectrometry From Surfaces"; el documento de patente de EE. UU. No. 6,107,623, titulada "Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry"; el documento de patente de EE. UU. No. 6,268,144, titulada "DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry"; el documento de patente de EE. UU. No. 6,124,137, titulada "Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes"; Wright y otros, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2:264-76 (1999); y Merchant y Weinberger, *Electrophoresis* 21: 1164-67 (2000).

En general, la detección por MS y el análisis pueden realizarse de diferentes maneras, dependiendo del objetivo del análisis. La proteómica descendente se refiere a un análisis intacto, que mantiene la integridad de la proteína para la detección de los productos de degradación, variantes de la secuencia y las combinaciones de las modificaciones postraduccionales. El análisis de péptidos ascendente implica la reducción, alquilación y digestión de muestras de proteínas purificadas para acceder y analizar fragmentos peptídicos.

Con el fin de aumentar las capacidades de resolución de masas y de determinación de masas de la espectrometría de masas, las muestras pueden procesarse antes del análisis de MS. Por consiguiente, la invención se refiere a métodos de detección de MS que se pueden combinar con tecnologías de inmuno-enriquecimiento, métodos relacionados con la preparación de muestras y/o métodos cromatográficos, preferentemente con cromatografía líquida (LC), más preferentemente con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC). Los métodos de preparación de muestras comprenden técnicas para lisis, fraccionamiento, digestión de la muestra en péptidos, depleción, enriquecimiento, diálisis, desalación, alquilación y/o reducción de péptidos. Sin embargo, estas etapas son opcionales. En un aspecto de la invención, es necesaria una digestión no proteolítica (por ejemplo, triptica) para medir un fragmento, por ejemplo, la SEQ NO: 2. La muestra puede someterse a inmuno-enriquecimiento antes del análisis por MS. Las tecnologías de inmunoensayo de espectrometría de masas, tales como la tecnología Thermo Fisher MSIA™, se pueden aplicar antes de la digestión, o la tecnología SISCAPA® después de la digestión.

La HPLC uni o multidimensional se puede usar para separar proteínas o péptidos. La mezcla de proteínas o péptidos se puede pasar a través de una sucesión de fases o dimensiones estacionarias cromatográficas lo que proporciona un mayor poder de resolución. El HPLC es adaptable para muchos enfoques experimentales y varias fases estacionarias y móviles se pueden seleccionar por su idoneidad para resolver clases específicas de proteínas o péptidos de interés y por compatibilidad entre sí y con métodos de detección e identificación de espectrometría de masas de aguas abajo. La HPLC se puede usar para separar muestras clínicas que han sido digeridas o no por una enzima proteolítica donde se generan los productos enzimáticos correspondientes de las mezclas de péptidos. La mezcla de péptidos correspondiente se puede pasar a través de una sucesión de fases o dimensiones estacionarias cromatográficas lo que proporciona un alto poder de resolución. La separación de péptidos y proteínas se basa en la secuencia peptídica, los grupos funcionales de la secuencia peptídica, así como en las propiedades físicas.

Por lo tanto, la detección por espectrometría de masas se puede combinar con la aplicación de la cromatografía líquida (LC), que se realiza antes de la detección por espectrometría de masas. Más preferentemente, se realiza una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) antes de la detección de masa.

En aspectos preferentes de la invención, los métodos basados en MS son no dependientes en la purificación preparatoria de las proteínas antes de la digestión proteolítica. Además, la eliminación de compuestos bioquímicos tales como lípidos, proteínas o ADN puede no ser necesaria antes de la digestión proteolítica. En aspectos preferentes, las etapas de purificación que separan las proteínas de acuerdo con sus propiedades físicas, es decir, cromatografía o centrifugación, pueden no ser necesarias antes de la digestión proteolítica. Además, la depleción de las proteínas abundantes o abundantes en grado medio puede no ser necesaria antes de la digestión proteolítica. Las proteínas abundantes pueden eliminarse mediante matrices tales como las columnas Ig-Y12. En el contexto de esta invención, dichas etapas de separación previa se denominan separación previa antes de la digestión proteolítica. Por consiguiente, las proteínas histona libre en la muestra biológica, tal como suero o plasma, se pueden detectar sin ningún tratamiento previo o separación previa antes de la digestión proteolítica.

En ciertos aspectos, la muestra biológica puede someterse a análisis por MS sin procedimientos de separación previos, por medio del cual se pueden realizar técnicas de inmuno-enriquecimiento y procedimientos de tratamiento previo. En esta una modalidad, la muestra se analiza preferentemente mediante infusión directa usando principios de electropulverización estática, análisis de inyección de flujo o inyección de flujo con enriquecimiento de la muestra.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "ionizando" o la "ionización" de moléculas de la muestra se refiere a diferentes técnicas que crean un ion del analito que tiene una carga eléctrica neta igual a una o más unidades de electrones. Dicha técnica puede ser la Ionización Química (CI), Ionización Electrónica (EI), Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB), Desorción/Ionización mediante Láser Asistido por Matriz (MAL-DI), Ionización por Electrospray (ESI), Desorción/Ionización mediante Láser de Superficie Mejorada (SELDI), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI), Plasma Acoplado Inductivamente (ICP), Desorción de Campo (FD), Termospray, Desorción/Ionización en el Silicio (DIOS), Espectrometría de Masas de Iones Secundaria (SIMS), Ionización por Chispa, Ionización Térmica o Ionización por Fijación de Iones.

La detección selectiva de iones de analitos puede realizarse con espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La espectrometría de masas en tándem se caracteriza por la etapa de selección de masa (tal y como se usa en el presente documento, el término "selección de masa" indica el aislamiento de iones que tienen una m/z especificada o un intervalo estrecho de m/z), seguido de la fragmentación de los iones seleccionados y el análisis de masa de los iones del producto (fragmento) resultante.

El ion del analito precursor puede fragmentarse mediante el uso de diferentes técnicas, que pueden seleccionarse de Disociación Inducida por Colisión (CID), Activación de multietapas (MSA), Disociación por Pulso q (PQD), Disociación por Transferencia de Electrones (ETD), disociación por capilar calentado (HTD), Disociación por Captura de Electrones (ECD) o Disociación Multifotónica Infrarroja (IRMPD), Disociación de Alta Energía Realizada en la Trampa C (HCD).

Tal como se usa en el presente documento, la espectrometría de masas en tándem se realiza preferentemente usando un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo. Un espectrómetro de masas en tándem se caracteriza porque el primer y el tercer cuadrupolo son filtros de masa, es decir, son capaces de transmitir selectivamente iones de una m/z deseada o un intervalo estrecho de m/z . El segundo cuadrupolo se emplea para la disociación inducida por colisión. Los iones de analitos precursores se seleccionan en el primer cuadrupolo y se disocian en el segundo cuadrupolo por colisión con un gas neutro. El tercer cuadrupolo filtra los fragmentos ionizados, que luego son detectados por un sistema de detección, que incluye opcionalmente un multiplicador de electrones (Hoffmann E., Journal of Mass Spectrometry, Vol. 31, 1996, 129-137).

Como se describe en el presente documento, se puede usar un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo para realizar la Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM), también llamada Monitorización de la Reacción Múltiple (MRM) y la Monitorización de la Reacción Cuantitativa Seleccionada (qSRM).

Alternativamente, los ensayos pueden utilizar la Monitorización de la Reacción en Paralelo (PRM) para la detección y cuantificación de los analitos diana. A diferencia de la MRM, que, como se describe a continuación, detecta y cuantifica en serie diferentes iones de productos al cambiar entre o entre transiciones características, la PRM detecta y cuantifica simultáneamente dos o más iones de productos resultantes de la fragmentación de un ion precursor común. En general, la PRM conlleva la acumulación y posterior análisis de masa de diferentes especies de iones de productos. En un ejemplo no limitativo, la PRM puede realizarse en el espectrómetro de masa Q Exactive disponible en Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania). En el espectrómetro de masas Q Exactive, los iones precursores de una m/z específica se transmiten selectivamente por un filtro de masa cuadrupolo a una celda de colisión, en donde colisionan a energías relativamente altas con moléculas o átomos de un gas neutro y, en consecuencia, sufren una disociación inducida por colisión para formar iones de producto. Los iones de productos recogidos, que incluyen diferentes especies de iones que tienen varias m/z , se liberan entonces a un analizador de masas de Trampa Electroestática Orbital (Orbitrap), que analiza en masa los iones de productos para generar un espectro de masas que representa las abundancias (intensidades) individuales de cada una pluralidad de especies de iones del producto.

Los métodos de detección pueden comprender ensayos en formatos tales como la Monitorización de las Reacciones Seleccionadas/Múltiples (SRM/MRM).

En este contexto, se prefiere que se utilice un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo para realizar SRM/MRM. La Monitorización de la Reacción Seleccionada Cuantitativa o SRM (qSRM) es una técnica para el análisis y la cuantificación de compuestos (proteínas) precisos en muestras biológicas complejas que produce un alto nivel de selectividad y sensibilidad. Tal y como se usa en el presente documento, "qSRM" se refiere a una monitorización de la reacción seleccionada como se describe a continuación, donde los péptidos seleccionados se cuantifican usando péptidos de referencia marcados isotópicamente o proteínas de longitud completa.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "SRM" define una técnica, donde se selecciona y aísla un analito precursor especial (péptido como sustituto de proteínas diana, aquí la proteína o proteínas histona libre que se detectan) dentro del espectrómetro de masas. El analito precursor ionizado está fragmentado y los fragmentos ionizados se monitorizan para la detección y cuantificación basado en sus relaciones de masa a carga. Los pares específicos de valores m/z asociados a los iones precursores y fragmentos se denominan "transiciones".

Dichas "transiciones" se refieren a un par específico de valores m/z de iones precursores/fragmentos a los que se sintonizan el primer y el tercer cuadrupolo. Dicha "transición" es esencial para la identificación y cuantificación de un

péptido específico, que es un sustituto para una proteína de interés en un digerido complejo de proteínas. De promedio, se miden 2-4 transiciones del sustituto y el péptido sintético de referencia marcado isotópicamente en un ensayo qSRM. Para la aplicación de mediciones SRM/qSRM, se sugiere tener al menos dos transiciones para cada péptido para garantizar la especificidad y ausencia de identificación errónea de las sustancias diana.

Generalmente, el establecimiento de un ensayo SRM/MRM comienza con la selección de un péptido o péptidos después de que se digiere la proteína de interés. Los péptidos adecuados (analito precursor) muestran una respuesta de señal alta significativa de la espectrometría de masas. En segundo lugar, se seleccionan fragmentos peptídicos, que son específicos para el analito precursor. Para cada fragmento de analito precursor, se puede llevar a cabo una optimización de los parámetros específicos de la MS, incluyendo la energía de colisión, los ajustes de la óptica iónica y el tiempo de permanencia. La siguiente validación de las transiciones confirma la detectabilidad en muestras biológicas (por ejemplo, plasma/suero) y evalúa el fondo. Al añadir los péptidos estándar marcados isotópicamente, se puede cuantificar el analito precursor. Para la selección de péptidos y fragmentos, se pueden utilizar herramientas de predicción (por ejemplo, un programa de software con una predicción algorítmica, bases de datos) para ayudar a elegir las transiciones óptimas.

Como se describió anteriormente, la invención se refiere en un aspecto a la detección y/o cuantificación de proteínas histona libre en muestras biológicas, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, por medio del cual se usa un método que comprende la aplicación de cromatografía líquida y un ensayo SRM y/o qSRM, que detecta específicamente péptidos de histona como péptidos sustitutos para la proteína histona libre.

En ciertas implementaciones, puede ser beneficioso utilizar un analizador de masas de alta resolución/masa precisa (HRAM) para la detección y medición de iones precursores y/o de productos formados a partir de las proteínas histona libre o péptidos derivados de las mismas. Los analizadores de masas HRAM son aquellos analizadores de masas que son capaces de adquirir espectros de masas con potencias de resolución que típicamente exceden los 15 K y con una precisión de masa típicamente menor de 5 partes por millón (ppm). Los ejemplos de analizadores de masas HRAM incluyen el analizador de resonancia transformada de Fourier de Resonancia Ion Ciclotrón (FT-ICR), el analizador de Trampa Electroestática Orbital, Orbitrap y ciertos analizadores de Tiempo de Vuelo (TOF) de reflexión múltiple o largo recorrido. Los instrumentos de espectrómetros de masas que incorporan un espectrómetro de masas HRAM incluyen las líneas de productos Exactive y Q Exactive disponibles en Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania). En general, los analizadores de masas HRAM permiten distinguir los analitos diana en el espectro de masas de las especies iónicas interferentes que tienen m/z muy similares, lo que facilita la identificación y cuantificación fiables del analito diana (por ejemplo, un ion formado a partir de una histona libre o su péptido sustituto). De esta manera, los analitos diana pueden detectarse y medirse con alta selectividad en una matriz biológica compleja, tal como el plasma sanguíneo. El uso de un analizador de masas HRAM puede permitir la omisión o la simplificación de la preparación de la muestra y las técnicas de separación destinadas a aislar el analito(s) diana de los componentes que interfieren en la muestra cuya presencia podría confundir la medición del analito(s) diana por espectrometría de masas. En ciertas aplicaciones, el uso de un analizador HRAM puede permitir la detección y cuantificación fiables de analitos diana utilizando abundancias de iones precursores (por ejemplo, en función de las intensidades que aparecen en un espectro completo de MS), obviando la necesidad de una etapa de fragmentación.

La cuantificación relativa por rSRM se puede lograr mediante:

1. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de las proteínas histona libre mediante la comparación del área del pico de la firma por SRM de un péptido de histona determinado detectado en una muestra biológica con la misma área del pico de la firma por SRM del mismo péptido del fragmento de histona en al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas.
2. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de proteínas histona libre mediante la comparación del área del pico de la firma por SRM de un péptido de histonas determinado detectado en una muestra biológica con las áreas del pico de la firma por SRM desarrolladas a partir de péptidos de fragmentos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, en las que la comparación del área del pico de la firma por SRM entre las dos muestras para un fragmento peptídico se normalizan para, por ejemplo, la cantidad de proteína analizada en cada muestra.
3. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de la proteína histona mediante la comparación del área del pico de la firma por SRM de un péptido de histonas determinado con las áreas del pico de la firma por SRM de otros péptidos de fragmentos derivados de diferentes proteínas dentro de la misma muestra biológica, a fin de normalizar los niveles variables de las proteínas histonas a los niveles de otras proteínas que no varían sus niveles de expresión en diversas condiciones celulares.
4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a los péptidos de fragmentos no modificados como a los péptidos de fragmentos modificados de proteínas histonas, cuando las modificaciones incluyen, pero no se limitadas a, la fosforilación y/o glicosilación, acetilación, metilación (mono, di, tri), citrulación, ubiquitinilación y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera que la determinación de las cantidades relativas de péptidos no modificados.

La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr mediante:

1. La comparación del área del pico de la firma por SRM/MRM para un péptido del fragmento dado de las proteínas histonas en una muestra biológica individual con el área del pico de la firma por SRM/MRM de un pico estándar de fragmento interno introducido en el lisado de proteína de la muestra biológica.

El estándar interno puede ser una versión sintética marcada del péptido del fragmento de las proteínas histonas que se está investigando o la proteína recombinante marcada. Este estándar se introduce en una muestra en cantidades conocidas antes (obligatorio para la proteína recombinante) o después de la digestión, y el área del pico de la firma por SRM/MRM se puede determinar tanto para el estándar de péptido del fragmento interno como para el péptido del fragmento nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de ambas áreas del pico. Esto se puede aplicar a péptidos de fragmentos no modificados y péptidos de fragmentos modificados, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glicosilación, acetilación, metilación (mono, di, tri), citrulinación, ubiquitinilación y donde los niveles absolutos de los péptidos modificados pueden determinarse de la misma manera como se determinan los niveles absolutos de los péptidos no modificados.

2. Los péptidos también se pueden cuantificar usando curvas de calibración externas. El enfoque de la curva normal utiliza una cantidad constante de un péptido pesado como standard interno y una cantidad variable de péptido sintético ligero introducido en la muestra. Se necesita utilizar una matriz representativa similar a la de las muestras de ensayo para construir curvas estándar para tener en cuenta un efecto de matriz. Además, el método de la curva inversa evita el problema del analito endógeno en la matriz, donde se introduce una cantidad constante de péptido ligero encima del analito endógeno para crear un estándar interno y se introducen cantidades variables de péptido pesado para crear un conjunto de estándares de concentración. Las muestras de ensayo que se comparan bien con las curvas normales o inversas se introducen con la misma cantidad de péptido estándar que el estándar interno introducido a la matriz utilizada para crear la curva de calibración.

Como se explicó anteriormente, la cantidad de proteínas histona libre en la muestra biológica se puede medir mediante la detección de la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona modificados o no modificados en un digerido de proteínas de dicha muestra biológica y opcionalmente separando la muestra con métodos cromatográficos, y sometiendo la muestra preparada y opcionalmente separada a espectrometría de masas en tándem de Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido de histona.

La invención también se refiere a un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra, dicho método comprende, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona modificados o no modificados en un digerido de proteínas de dicha muestra biológica y opcionalmente separar la muestra con métodos cromatográficos, y someter la muestra preparada y opcionalmente separada a espectrometría de masas en tándem de monitorización de la reacción seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido de histona, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca el residuo de aminoácido 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. La cuantificación de los péptidos de fragmentos de histona puede ser una cuantificación relativa por rSRM o una cuantificación absoluta.

La invención también proporciona un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra, dicho método comprende, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona en un digerido de proteínas de dicha muestra biológica sin la separación previa de dicha muestra antes de la digestión proteolítica y someter los péptidos separados a la espectrometría de masas en tándem de Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido de histona, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La invención también se refiere a un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra, dicho método comprende, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona modificados o no modificados en un digerido de proteínas de dicha muestra biológica sin separación previa de dicha muestra antes de la digestión proteolítica, y someter los péptidos separados a la espectrometría de masas en tándem de Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido de histona, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Además, la invención se refiere a un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra, dicho método comprende, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona no modificados en un digerido de proteínas de dicha muestra biológica sin separación previa de dicha muestra antes de la digestión proteolítica, y someter los péptidos separados a la espectrometría de masas en tándem de Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido de histona, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Además, la invención se refiere a un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra, dicho método comprende, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona no modificados sin digestión proteolítica de dicha muestra biológica, pero con la aplicación de procedimientos de tratamiento previo o procedimientos de enriquecimiento inmunitario antes de la separación previa de dicha muestra y someter los péptidos separados a la espectrometría de masas en tándem de Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido libre de histona, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para medir la cantidad de proteínas histona libre en una muestra que no ha sido sometida a digestión proteolítica (por ejemplo, trípica), dicho método comprende, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona mediante espectrometría de masas en tándem de Monitorización de la Reacción Seleccionada (SRM) para determinar las cantidades de al menos un péptido libre de histona, en donde la muestra ha sido sometida a procedimientos de tratamiento previo o procedimientos de enriquecimiento inmunitario antes de la detección, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

El siguiente ensayo ilustrativo y ejemplar también se puede usar en el contexto de la presente invención, sin embargo, se pueden aplicar igualmente otros ensayos. La muestra se digiere proteolíticamente, preferentemente mediante la adición de proteasas (por ejemplo, tripsina), lo que da como resultado una muestra que contiene péptidos de histona (péptidos sustitutos) específicos para la proteína histona. Para la cuantificación exacta del péptido sustituto, se añade un estándar interno en cantidades definidas a la muestra. Por lo tanto, se añade el péptido sintético marcado isotópicamente y representa la contraparte del péptido sustituto. El estándar interno también se puede adicionar antes de la digestión proteolítica. La muestra digerida que contiene los péptidos sustitutos y el standard interno correspondiente se separa ahora cromatográficamente aplicando un protocolo de LC/HPLC adecuado (columna de HPLC, gradiente, tiempo de elución). Tal y como se usa en el presente documento, la separación cromatográfica se realiza en línea, por medio del cual el eluato de la columna se transfiere directamente a la primera unidad de ionización del espectrómetro de masas. Alternativamente, se pueden coleccionar primero diferentes eluatos y luego analizarlos. Además de la cromatografía líquida, se pueden aplicar diferentes técnicas para la separación de las muestras, tales como las descritas en un párrafo anterior. Después de la etapa de separación, la masa del péptido sustituto seleccionado y los fragmentos correspondientes se determinará mediante el uso de un espectrómetro de masas, preferentemente mediante el uso de un espectrómetro de masas en tándem. La muestra, que contiene péptidos de histona, se ioniza en el espectrómetro de masas y los iones resultantes se transfieren a un primer filtro de masa. Como se describió anteriormente, solo los péptidos ionizados con la relación masa a carga (m/z) de interés se introducen selectivamente en la unidad de colisión, donde los péptidos precursores sufren fragmentación debido a las colisiones con el gas de colisión. Los iones de fragmentos de péptidos seleccionados son además transferidos al segundo filtro de masa. Después de la detección, se genera una señal, que representa la cantidad de iones de fragmentos de péptido de histona transferidos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos descritos en el contexto de los métodos de inmunoensayos de la invención también se pueden usar para inmunoprecipitar/inmunopurificar las histonas libres antes del análisis por MS, por medio del cual se puede aplicar o no una digestión con proteasas.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para medir la presencia o cantidad de proteína o proteínas histona libre en la muestra biológica, en donde el método comprende inmunopurificar proteínas histona libre usando un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o un derivado del mismo, que es específico para un epítipo comprendido en la proteína histona, separar la muestra con métodos cromatográficos, detectar la cantidad de uno o más péptidos de fragmentos de histona modificados o no modificados de dicha muestra biológica y someter la muestra preparada al análisis de MS, en donde una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en los métodos basados en MS de la presente invención, la muestra puede someterse a una digestión con proteasa, preferentemente digestión trípica, antes del análisis con MS. Sin embargo, en otros aspectos de la invención, la muestra no se somete a una digestión con proteasa, preferentemente digestión trípica, antes del análisis con MS.

De acuerdo con las explicaciones anteriores, los métodos basados en MS de la invención pueden comprender opcionalmente una o más de las siguientes etapas:

- (i) someter la muestra a un tratamiento previo tal como la adición de sustancias químicas o bioquímicas
- (ii) someter la muestra a una reacción de reducción y/o alquilación;
- (iii) separar la muestra con un método cromatográfico antes del análisis con MS y después de la digestión trípica;
- (iv) enriquecer la muestra usando un dispositivo de inmovilización (tal como la tecnología Thermo Scientific MSIA™)

o depletar componentes no deseados usando columnas de depleción.

(v) adicionar al menos un estándar de referencia interno, en donde el estándar de referencia es una versión marcada isotópicamente del péptido, o la proteína a detectar.

- 5 En los métodos basados en MS de la descripción, la proteína histona libre puede ser la histona H2A y al menos un fragmento peptídico de la misma seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24, 28, 29 y 30, preferentemente se detectan y opcionalmente se cuantifican fragmentos peptídicos seleccionados de las SEQ ID NO: 24 y 28.
- 10 En los métodos basados en MS de la invención, la proteína histona libre puede ser la histona H4 y al menos un fragmento peptídico de la misma seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 y 7, preferentemente se detectan y opcionalmente se cuantifican fragmentos peptídicos seleccionados de las SEQ ID NO: 3 y 4.
- 15 Los fragmentos y las transiciones de péptidos preferentes en el contexto de la presente invención se enumeran en las Tablas 4 y 5.

Secuencias

- 20 SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de la histona H4 humana, UniProt ID P62805.2, metionina inicial no incluida)
1 SGRGKGGKGL GKGGAKRHRK VLRDNIQGIT KPAIRRLARR GGVKRISGLI
51 YEETRGVLKV FLENVIRDAV TYTEHAKRKT VTAMDWYAL KRQGR TLYGF
101 GG
- 25 SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos de los residuos 46-102 de la SEQ ID NO: 1)
1 ISGLIYEETR GVLKV FLENV IRDAV TYTEH AKRKT VTAMD WYALKRQGR
51 TLYGFGG
- 30 SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de los residuos 46-55 de la SEQ ID NO: 1)
1 ISGLIYEETR
- SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos de los residuos 60-67 de la SEQ ID NO: 1)
1 VLENVIR
- 35 SEQ ID NO: 5 (secuencia de aminoácidos de los residuos 80-91 con K91 acetilado de la SEQ ID NO: 1)
1 TVTAMDVVYAL K
- SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de los residuos 24-35 de la SEQ ID NO: 1)
1 DNIQGITKPA IR
- 40 SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos de los residuos 68-77 de la SEQ ID NO: 1)
1 DAVTYTEHAK
- SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de H4-GR-17, posición 2-17 de la SEQ ID NO: 1)
45 1 GRGKGGKGLG KGGAKR
- SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos de H4-GH-18, posición 2-18 de la SEQ ID NO: 1)
1 GRGKGGKGLG KGGAKRH
- 50 SEQ ID NO: 10 (secuencia de aminoácidos de H4-LI-9, posición 22-30 de la SEQ ID NO: 1)
1 LRDNIQGIT
- SEQ ID NO: 11 (secuencia de aminoácidos de H4-LR-15, posición 22-35 de la SEQ ID NO: 1)
1 LRDNIQGITK PAIR
- 55 SEQ ID NO: 12 (secuencia de aminoácidos de H4-LL-17, posición 22-37 de la SEQ ID NO: 1)
1 LRDNIQGITK PAIRRL
- SEQ ID NO: 13 (secuencia de aminoácidos de H4-PR-15, posición 32-45 de la SEQ ID NO: 1)
60 1 PAIRRLARRG GVKR
- SEQ ID NO: 14 (secuencia de aminoácidos de H4-PS-17, posición 32-47 de la SEQ ID NO: 1)
1 PAIRRLARRG GVKRIS
- 65 SEQ ID NO: 15 (secuencia de aminoácidos de H4-EE-13, posición 52-63 de la SEQ ID NO: 1)
1 EETRGVLKVF LE

ES 2 800 848 T3

	SEQ ID NO: 16 (secuencia de aminoácidos de H4-EN-14, posición 52-64 de la SEQ ID NO: 1)				
	1 EETRGLVKVF LEN				
5	SEQ ID NO: 17 (secuencia de aminoácidos de H4-RR-13, posición 67-78 de la SEQ ID NO: 1)				
	1 RDAVTYTEHA KR				
	SEQ ID NO: 18 (secuencia de aminoácidos de H4-RK-14, posición 67-79 de la SEQ ID NO: 1)				
	1 RDAVTYTEHA KRK				
10	SEQ ID NO: 19 (secuencia de aminoácidos de H4-TK-13, posición 80-91 de la SEQ ID NO: 1)				
	1 TVTAMDVVYA LK				
	SEQ ID NO: 20 (secuencia de aminoácidos de H4-TR-14, posición 80-92 de la SEQ ID NO: 1)				
15	1 TVTAMDVVYA LKR				
	SEQ ID NO: 21 (secuencia de aminoácidos de H4-RG-9, posición 92-99 de la SEQ ID NO: 1)				
	2 RQGRTLYG				
20	SEQ ID NO: 22 (secuencia de aminoácidos de H4-RG-12, posición 92-102 de la SEQ ID NO: 1)				
	3 RQGRTLYGFG G				
	SEQ ID NO: 23 (secuencia de aminoácidos de la histona H2A tipo 1 humana, UniProt ID Q96QV6, metionina inicial no incluida)				
25					
	1	SGRGKQGGKA RAKSKSRSSR	AGLQFPVGRI	HRLLRKGNYA	ERIGAGAPVY
	51	LAHVLEYLTA EILELAGNAS	RDNKKTRIIP	RHLQLAIRND	EELNKLGGV
30					
	101	TIAQGGVLPN IQAVLLPKKT	ESHHHKAQSK		
	SEQ ID NO: 24 (secuencia de aminoácidos de HA-AR-10, posición 21-29 de la SEQ ID NO: 23)				
35	1 AGLQFPVGR				
	SEQ ID NO: 25 (secuencia de aminoácidos de HA-AH-12, posición 21-31 de la SEQ ID NO: 23)				
	1 AGLQFPVGRI H				
40	SEQ ID NO: 26 (secuencia de aminoácidos de HA-IL-23, posición 30-51 de la SEQ ID NO: 23)				
	1 IHRLLRKGN Y AERIGAGAPV YL				
	SEQ ID NO: 27 (secuencia de aminoácidos de HA-IA-25, posición 30-53 de la SEQ ID NO: 23)				
45	1 IHRLLRKGN Y AERIGAGAPV YLAA				
	SEQ ID NO: 28 (secuencia de aminoácidos de los residuos 82-88 de la SEQ ID NO: 23)				
	1 HLQLAIR				
50	SEQ ID NO: 29 (secuencia de aminoácidos de los residuos 89-95 de la SEQ ID NO: 23)				
	1 NDEELNK				
	SEQ ID NO: 30 (secuencia de aminoácidos de los residuos 100-118 de la SEQ ID NO: 23)				
	1 VTIAQGGVLP NIQAVLLPK				
55	SEQ ID NO: 31 (secuencia de aminoácidos de la histona H2B humana, UniProt ID P62807)				
	1	MPEPAKSAPA	PKKGSKKAVT	KAQKKDGKKR	KRSRKESYSV YVYKVLKQVH
60					
	51	PDTGISSKAM	GIMNSFVNDI	FERIAGEASR	LAHYNKRSTI TSREIQTAVR
	101	LLPGELAKH	AVSEGTKAVT	KYTSSK	
65					

ES 2 800 848 T3

SEQ ID NO: 32 (secuencia de aminoácidos de los residuos 94-100 de la SEQ ID NO: 31)
1 EIQTAVR

SEQ ID NO: 33 (secuencia de aminoácidos de los residuos 101-109 de la SEQ ID NO: 31)
1 LLLPGELAK

SEQ ID NO: 34 (secuencia de aminoácidos de la histona H2B humana, UniProt ID Q6DN03.3, metionina inicial no incluida)

1	MPEPAKFAPA	PKKGSKKAVT	KAQKKDGKKR	KRSRKESYSI	YVYKVLKRVH
51	PDTGIWCKAM	GIMNSFLNDI	FERIAGEASR	LAHYNKRSTI	TSRRSRRPCA
101	CCCPASWPST	PCPRAPRRSP	STPAPSESLP	GPGARSLPPS	LPPRVAGCFV
151	SKGSFQGHLT	TSVKESFLCC	QSQLMFLASR	LVNFRRAHNT	KHR

SEQ ID NO: 35 (secuencia de aminoácidos de los residuos 181-193 de la SEQ ID NO: 34)
1 LVNFRRAHNTKHR

SEQ ID NO: 36 (secuencia de aminoácidos de la histona H3.1 humana, UniProt ID P68431.2, metionina inicial no incluida)

1	ARTKQTARKS	TGGKAPRKQL	ATKAARKSAP	ATGGVKKPHR	YRPGTVALRE
51	IRRYQKSTEL	LIRKLPFQRL	VREIAQDFKT	DLRFQSSAVM	ALQEACEAYL
101	VGLFEDTNLC	AIHAKRVTIM	PKDIQLARRI	RGERA	

SEQ ID NO: 37 (secuencia de aminoácidos de los residuos 57-63 de la SEQ ID NO: 36)
1 STELLIR

SEQ ID NO: 38 (secuencia de aminoácidos de los residuos 117-122 de la SEQ ID NO: 36) 1 VTIMPK

SEQ ID NO: 39 (secuencia de aminoácidos de los residuos 41-49 de la SEQ ID NO: 36) 1 YRPGTVALR

SEQ ID NO: 40 (secuencia de aminoácidos de la histona H2A tipo 3 humana, UniProt ID Q7L7L0.3, metionina inicial no incluida), H2A SRP0406 recombinante de Sigma

1	SGRGKQGGKA	RAKAKSRSSR	AGLQFPVGRV	HRLLRKGNYS	ERVGAGAPVY
51	LAHVLEYLTA	EILELAGNAA	RDNKKTRIIP	RHLQLAIRND	EELNKLLGRV
101	TIAQGGVLPN	IQAVLLPKKT	ESHHKAKGK		

SEQ ID NO: 41 (secuencia de aminoácidos de la histona H1 humana, UniProt ID P07305, metionina inicial no incluida)

1	TENSTSAPAA	KPKRAKASKK	STDHPKYSDM	IVAAIQAEN	RAGSSRQSIQ
51	KYIKSHYKVG	ENADSQIKLS	IKRLVTTGVL	KQTKGVGASG	SFRLAKSDEP
101	KKSVAFKKTK	KEIKKVATPK	KASKPKKAAS	KAPTKKPKAT	PVKKAKKKLA
151	ATPKKAKKPK	TVKAKPVKAS	KPKKAKPVKP	KAKSSAKRAG	KKK

Ejemplos

Los siguientes ejemplos y figuras se utilizan para una explicación más detallada de la invención, pero dichos ejemplos y figuras no limitan la invención a.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos

A. Péptidos

Los péptidos relacionados con la secuencia de aminoácidos de la histona H4 fueron sintetizados químicamente y purificados (>90 %) por Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Alemania, New England Peptide Inc, Gardner, MA, EE. UU., O JPT Peptide Technologies GmbH. Los péptidos de inmunización se conjugaron con albúmina de suero bovino usando sulfo-MBS (éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimídico (BSA, Sigma Aldrich) o con hemocianina de lapa californiana (KLH, Thermo Fisher Scientific) a través de una cisteína N-terminal adicional. Los péptidos utilizados para la purificación por afinidad de los anticuerpos contenían uno o dos aminoácidos C-terminales adicionales en comparación con los péptidos utilizados para la inmunización y una cisteína N-terminal adicional para la inmovilización en la resina de acoplamiento SulfoLink.

B. Desarrollo de anticuerpos monoclonales

Se generaron anticuerpos policlonales de oveja dirigidos frente a H4-LI-9 (aminoácidos 22-30 de la histona H4, SEQ ID NO: 10), H4-EE-13 (aminoácidos 52-63 de la histona H4, SEQ ID NO: 15), H4-RR-13 (aminoácidos 67-78 de la histona H4, SEQ ID NO: 17) y H4-RG-9 (aminoácidos 92-99 de la histona H4, SEQ ID NO: 21) de acuerdo con procedimientos estándar (véase, EP 1488209 A1, EP 1738178 A1). Brevemente, los péptidos se acoplaron a la proteína transportadora KLH usando MBS a través de una cisteína N-terminal adicional. Los conjugados se usaron para inmunizar ovejas de acuerdo con el siguiente esquema: Una oveja se inmunizó inicialmente con 100 µg de conjugado (la masa se refiere al resto peptídico del conjugado) y se reforzó con 50 µg a partir de entonces en intervalos de cuatro semanas. Cuatro meses después de la inmunización inicial, se obtuvieron 300 ml de antisuero de ovejas.

Se generaron anticuerpos policlonales de conejo dirigidos frente a HA-AR-10 (aminoácidos 21-29 de la histona H2A tipo 1, SEQ ID NO: 24) y HA-IL-23 (aminoácidos 30-51 de la histona H2A tipo 1, SEQ ID NO: 26) de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, los péptidos se acoplaron a KLH usando MBS a través de una cisteína N-terminal adicional. Los conjugados se usaron para inmunizar conejos de acuerdo con el siguiente esquema: Un conejo se inmunizó inicialmente con 800 µg de conjugado (la masa se refiere al resto peptídico del conjugado) y comenzando en la cuarta semana se reforzaron 3 veces con 500 µg a partir de entonces en intervalos semanales. Dos meses después de la inmunización inicial, se obtuvieron cada 20 mL de antisuero de conejos.

Los anticuerpos específicos de antígeno se purificaron a partir de los antisueros respectivos de la siguiente manera: 5 mg del péptido de purificación (véase la tabla 1 a continuación) se acoplaron a 5 mL de SulfoLinkgel (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.). Se incubaron 50 mL de antisuero con el gel por lotes durante 4 horas a temperatura ambiente. La suspensión se transfirió a una columna (columna NAP25 vacía, GE Healthcare Life sciences). Después de desechar el primer flujo y la columna se lavó con 100 ml de tampón de lavado (KPi 100 mM, Tween-20 al 0,1 %, pH 6,8), y los anticuerpos unidos específicamente se eluyeron con ácido cítrico 50 mM; pH 2,7. El eluato se dializó frente a NaPi 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0.

Tabla 1. Péptidos usados para la generación de anticuerpos policlonales frente a la histona H4 e histona H2A

Péptido de inmunización	SEQ ID NO	Péptido de purificación	SEQ ID NO
Histona H4			
H4-GR-17	8	H4-GH-18	9
H4-LI-9	10	H4-LI-9	10
H4-LR-15	11	H4-LL-17	12
H4-PR-15	13	H4-PS-17	14
H4-EE-13	15	H4-EN-14	16
H4-RR-13	17	H4-RK-14	18
H4-TK-13	19	H4-TR-14	20
H4-RG-9	21	H4-RG-9	21

Histona H2A			
HA-AR-10	24	HA-AH-12	25
HA-IL-23	26	HA-IA-25	27

C. Desarrollo de anticuerpos monoclonales

Se generaron anticuerpos monoclonales frente a H4-GR-17 (aminoácidos 2-17 de la histona H4, SEQ ID NO: 8), H4-LI-9 (aminoácidos 22-30 de la histona H4, SEQ ID NO: 10), H4-EE-13 (aminoácidos 52-63 de la histona H4, SEQ ID NO: 15), H4-RR-13 (aminoácidos 67-78 de la histona H4, SEQ ID NO: 17), H4-TK-13 (aminoácidos 80-91 de la histona H4, SEQ ID NO: 19), H4-RG-12 (aminoácidos 92-102 de la histona H4, SEQ ID NO: 22) y la histona H3 de longitud completa (Sigma Aldrich SRP0177, SEQ ID NO: 36) por procedimientos estándar (Lane, R. D. J Immunol Methods, 1985, 81(2): 223-228). En este estudio, se evaluó el período de exposición de la mezcla de linfocitos-células de mieloma al fusógeno por su influencia sobre el rendimiento de las colonias de hibridoma totales y las que secretaban anticuerpos monoclonales. Las células de mieloma Sp2/0 y FOX-NY se fusionaron durante períodos variables con linfocitos esplénicos murinos inmunizados con glóbulos rojos de oveja. El período de fusión óptimo consistió en adicionar el fusógeno (5,0 mL de Kodak 1450 PEG; 0,5 mL de dimetilsulfóxido y 4,5 mL de disolución salina tamponada con fosfato; pH 7,0) a la mezcla celular durante un período de 45 s a 37 grados °C. El proceso de fusión se detuvo diluyendo gradualmente la mezcla en 50 mL de RPMI-1640. Después de 10 minutos, las células se centrifugaron, se resuspendieron en medio selectivo con macrófagos alimentadores y se cultivaron. En comparación con las técnicas comunes de fusión más largas, este procedimiento produce un aumento de aproximadamente 5 veces en el número de híbridos producidos cuando se usan las células Sp2/0 y un aumento de 30 veces en el número de híbridos producidos cuando se usan las células FOX-NY como compañero de fusión. En ambos casos, prácticamente todos los pocillos contienen colonias de hibridomas secretoras de anticuerpos monoclonales. Esta técnica de fusión de alta eficiencia se puede usar de manera más ventajosa para producir anticuerpos monoclonales frente a inmunógenos débiles o para reducir el tiempo necesario para la inmunización con inmunógenos más fuertes.

Brevemente, en el presente documento, los péptidos se conjugaron con BSA usando Sulfo-MBS (éster maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimídico). Con estos conjugados y la histona H3, se inmunizaron y se reforzaron ratones Balb/c, y las células esplénicas se fusionaron con las células de mieloma SP2/0 para generar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares se cribaron por su capacidad para secretar anticuerpos que se unen al péptido del cribado (véase la tabla 2) y a la proteína histona recombinante de longitud completa, que se usaron para recubrir una fase sólida de poliestireno. Se generaron líneas celulares que secretan anticuerpos monoclonales AK 654/F3 y 654/H10 (frente a H4-GR-17), AK 602/F11 y 602/G3 (frente a H4-LI-9) y AK 660/D2, AK 660/G9, AK 660/F6, AK 660/E9, AK 660/G3 y AK 660/F7 (frente a la histona H3).

Además, se compró a Abeam, un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente a una región dentro de los residuos 50-102 de la histona H4 (# ab31830).

Tabla 2. Péptidos usados para la generación de anticuerpos monoclonales frente a la histona H4 e histona H3

Péptido de inmunización	SEQ ID NO	Péptido de cribado	SEQ ID NO
Histona H4			
H4-GR-17	8	H4-GH-18	9
H4-LI-9	10	H4-LI-9	10
H4-EE-13	15	H4-EN-14	16
H4-RR-13	17	H4-RK-14	18
H4-TK-13	19	H4-TR-14	20
H4-RG-12	22	H4-RG-12	22
Histona H3			
Histona H3 recombinante	36	Histona H3 recombinante	36

D. Marcaje de los anticuerpos

Los anticuerpos se marcaron de acuerdo con los procedimientos estándar (EP 1488209 A1, EP 1738178 A1): la concentración del anticuerpo purificado respectivo se ajustó a 1 g/L, y el anticuerpo se marcó por incubación con el

marcador quimioluminiscente MACN-Acridinio-NHS-Éster (1 g/L; InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) en una relación molar 1:5 durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen 1/10 de glicina 50 mM durante 10 min a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se separó del marcador libre mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna NAP-5 (GE Healthcare Life sciences) y una columna de HPLC Bio-Sil® SEC-400-5 (Bio-Rad).

Ejemplo 2: Desarrollo del inmunoensayo de histona libre

A. Recubrimiento con los anticuerpos

Los anticuerpos se recubrieron de acuerdo con los procedimientos estándar (EP 1488209 A1, EP 1738178 A1): los StarTubes de poliestireno (Greiner) se recubrieron con el anticuerpo purificado (por tubo, 2 µg de anticuerpo en 300 µL de Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8) durante la noche a 22 °C. Los tubos entonces se bloquearon con NaPi 10 mM (pH 6,5) que contenía 30 g/L de Karion FP (Merck), 5 g/L de BSA sin proteasa (Sigma Aldrich) y se liofilizaron.

B. Ensayo de referencia de la histona H4 usando anticuerpos poli y monoclonales y disponibles comercialmente

Histona H4: Se establecieron varios inmunoensayos de la histona en sándwich usando los componentes policlonales y monoclonales descritos anteriormente y usando la histona H4 recombinante humana de longitud completa (Sigma Aldrich # SRP0178, SEQ ID NO:1). Se observaron las mejores señales en muestras de suero y plasma con EDTA usando las combinaciones que usan anti-H4-LI-9 (variante V1) y anti-H4-RR-13 (variante V2) recubiertas en tubos y el ab31830 anti-histona H4 de Abcam dirigido frente a residuos dentro de los aminoácidos 50-102 de la histona H4. No se observó señal en las muestras de voluntarios sanos (las señales estaban por debajo de la sensibilidad del ensayo funcional), sin embargo, las muestras de los pacientes con niveles elevados de procalcitonina estaban por encima de la sensibilidad del ensayo funcional (FAS), lo que sugiere una infección bacteriana grave o sepsis (Figura 1). Ambas combinaciones del ensayo se correlacionaron, pero los niveles más bajos se midieron cuando se usó la combinación H4-LI-9, posiblemente debido a la proteólisis del analito (SEQ ID NO: 1) entre las regiones H4-LI-9 (SEQ ID NO: 10) y H4-RR-13 (SEQ ID NO: 17) lo que conduce a una concentración más baja de los fragmentos más grandes de la histona H4 que de los fragmentos más pequeños C-terminales (Figura 2 y 3).

Se mezclaron 50 µL de los estándares (histona H4 recombinante humana de longitud completa de Sigma Aldrich # SRP0178, SEQ ID NO: 1) o muestras de pacientes y 200 µL de tampón que contenía el anticuerpo marcado con MACN en los tubos recubiertos (KPi 300 mM; pH 7,0; NaCl 50 mM; EDTA 10 mM; NaN₃ al 0,09 %; BSA al 0,1 %; IgG bovina inespecífica al 0,1 %; IgG inespecífica al 0,1 %; IgG inespecífica de ratón al 0,01 %) y contenía 0,5 x 10⁶ unidades relativas de luz (RLU) de anticuerpo marcado con MACN por 200 µL. Los tubos se incubaron 18-24 horas a temperatura ambiente. Después, los tubos se lavaron 4 veces con 1 mL de disolución de lavado universal B.R.A.H.M.S 50x (TRIS 400 mM, NaCl 3 M, Tween20 al 1 %, antiespumante de silicona al 0,001 % (Thermo Fisher Scientific, B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf, Alemania) y la quimioluminiscencia unida se midió durante 1 s por tubo con el luminómetro LB925T (Berthold). Las concentraciones de las muestras se calcularon utilizando el software Multicalc (Spline Fit).

C. Curva de respuesta a la dosis

Se creó una curva de respuesta a la dosis usando la histona H4 recombinante (Sigma Aldrich # SRP0178, SEQ ID NO: 1) como material estándar en los dos inmunoensayos descritos anteriormente. Las curvas de respuesta a la dosis típica se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 3: Correlación entre el SRM y el inmunoensayo

Las mismas muestras que se probaron en el inmunoensayo de la presente invención se evaluaron con el ensayo SRM de la presente invención descrito en el presente documento a continuación.

La Figura 5 muestra que los ensayos LIA y SRM de la histona H4 de la presente invención se correlacionan muy bien con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,95; lo que indica que ambos ensayos miden el mismo analito. Por la misma razón que los anticuerpos específicos para los residuos ubicados en la parte central de la histona H4 no pueden unirse cuando la histona se complejiza en un octámero, la proteasa tripsina es incapaz de alcanzar los sitios potenciales de escisión en esa región. Por lo tanto, solo las histonas libres se pueden escindir en la parte central y los péptidos detectables, tales como las SEQ ID NO: 3 y 4, que se originan a partir de esa región, solo pueden ser generados a partir de las histonas libres.

Ejemplo 4: Comparación entre el inmunoensayo tipo sándwich y el ensayo SRM de la presente invención y un ELISA disponible comercialmente de Roche que se dirige frente a nucleosomas.

La histona H4 recombinante de longitud completa, que se usó para generar la curva estándar que se muestra en la figura 4, se ensayó en un sistema ELISA disponible comercialmente de Roche: a pesar del hecho de que el ELISA de detección de muerte celular de Roche (#11544675001) está diseñado para la determinación específica de mono y

oligonucleosomas en la fracción citoplasmática de lisados celulares, se ensayó su rendimiento en muestras de suero y plasma con EDTA, debido a que las histonas H2A, H2B, H3 y H4 forman el núcleo octamérico de los nucleosomas. El ensayo contiene una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo dirigido frente a las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de mamíferos y un anticuerpo de detección dirigido frente al ADN. Debido a que el kit no incluye material estándar, se usan nucleosomas nativos (BPS Bioscience # 52015) para estimar las concentraciones de la matriz. Los niveles de nucleosomas eran elevados o no eran detectables en pacientes con niveles elevados de procalcitonina, usando las mismas muestras que se probaron para las concentraciones de la histona H4 que se muestran en la Figura 1 (Figura 6). Por lo tanto, no se puede concluir una correlación entre los niveles de nucleosoma y la histona H4 libre (Figura 7). Además, se probaron los analitos disponibles comercialmente introducidos en el suero cero: histona H2A recombinante humana (Sigma Aldrich # SRP0406, SEQ ID NO: 23), histona H3 recombinante humana (Sigma Aldrich # SRP0177, SEQ ID NO: 36) y la histona H4 (Sigma Aldrich # SRP0178, SEQ ID NO: 1) y los nucleosomas nativos humanos (BPS Bioscience # 52015). La Tabla 3 enumera qué analitos pueden ser detectados mediante el LIA de la histona H4 de BRAHMS o el ELISA de detección de muerte celular de Roche. El LIA de la histona H4 era específico para la histona H4 humana, no detectó la histona H2A y H3 y, lo que es más importante, no detectó los nucleosomas nativos. Esto sugiere que los epítomos de la histona H4, que son reconocidos por los anticuerpos usados en el inmunoensayo descrito en la presente invención, no son accesibles cuando la histona H4 es parte del núcleo octamérico de los nucleosomas. Sin embargo, cuando la histona H4 está libre en disolución, el LIA de la histona H4 es capaz de detectar los niveles de la histona H4 en matrices que incluyen suero y plasma con EDTA. Por el contrario, el ELISA de detección de muerte celular de Roche detecta los nucleosomas, pero ninguna de las histonas.

Tabla 3: Comparación de la detección de analitos por el inmunoensayo de la histona H4 de BRAHMS frente al kit de muerte celular de Roche.

Analito	LIA de la Histona H4 de BRAHMS	ELISA de Detección de Muerte Celular de Roche
Histona H4 recombinante de longitud completa (Sigma SRP0178)	Sí	No
Histona H2A recombinante de longitud completa (Sigma SRP0406)	No	No
Recombinante Histona H3 de longitud completa (Sigma SRP0177)	No	No
Recombinante Nucleosomas (BPS Bioscience 52015)	No	Sí

Ejemplo 5: Monitorización de la Reacción Seleccionada basado en espectrometría de masas (SRM)

La SRM es una técnica basada en MS para la cuantificación y la detección dirigida de los péptidos proteotípicos previamente seleccionados con propiedades definidas de fragmentación detectables en un contexto altamente complejo tal como el suero o el plasma derivado de sangre.

Los péptidos específicos derivados de la histona H4 y de la histona H2A, referidos como H4 y H2A, fueron detectados por la tecnología LC-MS/MS (espectrómetro de masas TSQ Vantage (MS); ThermoFisher Scientific). Los resultados del descubrimiento fueron confirmados por el análisis del SRM que muestra que los péptidos derivados de H4 se alteran a lo largo del curso de una infección del torrente sanguíneo en evolución. Se encontró que las secuencias peptídicas identificadas y los iones de fragmentación de las mismas, llamados transiciones, para cada péptido, son sustitutos útiles para monitorizar los niveles de proteína H4 y H2A en una muestra de sangre.

El ensayo cuantitativo del SRM descrito a continuación se desarrolló para medir los niveles cuantitativos relativos de los péptidos no modificados derivados de histonas generados por digestión trípica de proteínas plasmáticas o séricas.

La optimización se realizó en proteínas recombinantes compradas a Sigma. Se cribaron todos los péptidos trípticos posibles y se seleccionaron los mejores péptidos considerando la señal al ruido (véanse las Tablas 4 y 5). Se estableció el tiempo de retención, el tiempo de permanencia y la energía de colisión óptimos para al menos 4 mejores transiciones.

Un ejemplo para el péptido VFLENVIR (SEQ ID NO: 4) se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 6: Configuración de un ensayo por SRM/MRM para proteínas histonas

Ensayo de SRM/MRM en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para péptidos de fragmentos individuales

La SRM es una técnica basada en MS para la detección y cuantificación dirigida de péptidos proteotípicos previamente seleccionados con propiedades definidas de fragmentación detectables en un contexto altamente complejo tal como suero o plasma derivado de sangre.

5 El ensayo cuantitativo de SRM descrito a continuación se desarrolló para medir los niveles cuantitativos de péptidos no modificados derivados de histonas generados por digestión trípica de proteínas plasmáticas o séricas.

10 Los péptidos específicos derivados de la histona H4 y de la histona H2A, referidos como H4 y H2A, fueron detectados por la tecnología LC-MS/MS (espectrómetros de masas TSQ Vantage y TSQ Quantiva (MS); ThermoFisher Scientific). Se encontró que las secuencias peptídicas identificadas y los iones de fragmentación de las mismas, llamados transiciones, para cada péptido, son sustitutos útiles para monitorizar los niveles de proteína H4 y H2A en una muestra de sangre.

15 La optimización se realizó en proteínas recombinantes compradas a Sigma. Se cribaron todos los péptidos tríplicos posibles y se seleccionaron los mejores péptidos considerando la señal al ruido (véanse las Tablas 4 y 5). Se estableció el tiempo de retención, el tiempo de permanencia y la energía de colisión óptimos para al menos 4 mejores transiciones.

20 La cuantificación relativa y/o la cuantificación absoluta se pueden realizar en muestras clínicas y los rendimientos de los ensayos se evaluaron utilizando curvas normales o curvas inversas.

Ejemplo 7: Demostración de la cuantificación por MS/Selección de péptidos y transiciones

25 A. Preparación de la muestra

30 Las muestras de plasma (12 µL) se descongelaron en hielo y se mezclaron con 50 µL de urea 8 M/n-propanol al 2,5 %/Tris-HCl 200 mM/DTT 10 mM pH 8,5. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las muestras, entonces se alquilaban con 5 µL de ácido yodo acético 500 mM en bicarbonato de amonio 1 M, y se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. El agente de alquilación residual, entonces se hizo reaccionar con 3,3 µL de DTT 500 mM. Las muestras, entonces se diluyeron con 260 µL de Tris-HCl 50 mM, tampón de CaCl₂ 5 mM pH 8. Después, se adicionaron 150 µL de tripsina (Pierce, 20 µg en ácido acético 25 mM) a cada muestra, obteniéndose una relación de 1:50 de tripsina:proteína. Se dejó que las muestras se digirieran durante 18 horas a 37 °C. Para las operaciones de descubrimiento, se cargaron 300 ng de muestra en una columna Hypersil Gold de 50 mm 31 mm a 1,9 µm (ThermoFisher Scientific), antes del análisis por espectrometría de masas.

40 Los ensayos de SRM se desarrollaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Vantage, bomba Surveyor MS, auto-muestreador CTC PAL y una fuente IonMax equipada con una aguja de metal de alto flujo (Thermo Fisher Scientific) o en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantiva acoplado con HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). Las separaciones en fase inversa se llevaron a cabo en un gradiente lineal de 20 min desde 5 % hasta 40 % de B, con un tiempo corrida total de 40 min (Disolvente A: agua, FA (ácido fórmico) al 0,2 %, Disolvente B: ACN (acetonitrilo), FA al 0,2 %). La velocidad de flujo durante el gradiente lineal se ajustó a 240 µL/min. El volumen total de inyección fue de 160 µL para todas las muestras y puntos en la curva. Se corrió en una columna ACCUCORE 2,6 µm AQ 150 X 2,1 mm (ThermoFisher Scientific) a una temperatura de 50 °C.

45 Se añadieron 5 µL de cada muestra clínica de plasma a 20 µL de urea 8 M/n-propanol al 2,5 %/Tris-HCl 300 mM/DTT 10 mM pH 8,5 y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se adicionó ácido yodo acético 500 mM preparado en bicarbonato de amonio 1 M a cada pocillo de muestra y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Se adicionaron 113 µL de 50 mM Tris-HCl/CaCl₂ 5 mM pH 8,0 a cada pocillo. La tripsina (Pierce, ThermoFisher Scientific) se rehidrató con 150 µL de ácido acético 25 mM y se adicionó con una relación 1:10 (contenido total de proteína:proteasa) y se incubó a 37 °C durante 20 horas. La digestión finalmente se detuvo con 2 µL adicionales de ácido fórmico. Después, se adicionaron glucagón (1 ng/µL) y péptidos pesados estándar antes de la inyección.

50 La lisina o la arginina C-terminal de los péptidos marcados isotópicamente se sintetizaron químicamente y se purificaron (>95 % de pureza del péptido, >99 % de pureza isotópica) por Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Alemania, o New England Peptide Inc, Gardner, MA, EE. UU.

60 La información del tiempo de retención obtenida de los experimentos de MS de descubrimiento se importó a Pinpoint (ThermoFisher Scientific) para construir un método de SRM preliminar programado para la optimización. Los parámetros individuales del instrumento, tales como la energía de colisión, la lente del tubo, el tiempo de permanencia y los tiempos de retención previstos, se ensayaron automáticamente para cada transición. Después de múltiples iteraciones, se finalizó la lista optimizada (es decir, la señal de mayor intensidad y la menor superposición con otras transiciones) de péptidos y transiciones y se eligieron al menos dos péptidos proteotípicos por proteína y al menos cuatro transiciones de fragmentos por péptido.

65 Las Tablas 4 y 5 enumeran todos los péptidos analizados para las proteínas H4 y H2A humanas. Se cribó un total de

6 péptidos para los péptidos de la histona H4 y 6 péptidos para la histona H2A.

El análisis de transiciones se realizó en detalle para 5 péptidos, con respecto a la histona H4. Los péptidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 3 y 4 se analizaron como péptidos con marcaje pesado y se monitorearon de 4 a 5 transiciones para cada péptido.

Con respecto a la histona H2A, el análisis de transiciones se realizó en detalle para 4 péptidos. Los péptidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 24 y 28 se analizaron como péptidos con marcaje pesado y se monitorearon de 4 a 5 transiciones para cada péptido.

Los péptidos se identificaron mediante la co-elución de transiciones con marcaje ligero y pesado en la separación cromatográfica. Se utilizaron los programas informáticos Pinpoint (Thermo Fisher Scientific) o Skyline (de código abierto) para la alineación del tiempo, la cuantificación relativa de las transiciones y la cuantificación de las proteínas objetivo.

Tabla 4. Péptidos y transiciones de ejemplo monitoreados para H4.

SEQ ID NO	Secuencia peptídica	Precursor m/z	Fragmento m/z	Estado de carga del precursor	Estado de carga del fragmento	Tipo iónico del fragmento
3	ISGLIYEETR	590,814	697,315	2	1	y5
3	ISGLIYEETR	590,814	810,399	2	1	y6
3	ISGLIYEETR	590,814	980,504	2	1	y8
3	ISGLIYEETR	590,814	1067,536	2	1	y9
3	ISGLIYEETR	590,814	534,251	2	1	y4
4	VFLENVIR	495,293	387,271	2	1	y3
4	VFLENVIR	495,293	501,314	2	1	y4
4	VFLENVIR	495,293	630,356	2	1	y5
4	VFLENVIR	495,293	743,441	2	1	y6
4	VFLENVIR	495,293	890,509	2	1	y7
5	TVTAMDVVYALK	655,855	807,461	2	1	y7
5	TVTAMDVVYALK	655,855	938,501	2	1	y8
5	TVTAMDVVYALK	655,855	1009,538	2	1	y9
5	TVTAMDVVYALK	655,855	1110,586	2	1	y10
6	DNIQGITKPAIR	442,589	456,292	3	1	y4
6	DNIQGITKPAIR	442,589	584,387	3	1	y5
6	DNIQGITKPAIR	442,589	685,435	3	1	y6
6	DNIQGITKPAIR	442,589	428,274	3	2	y8
7	DAVITYTEHAK	567,775	585,299	2	1	y5
7	DAVITYTEHAK	567,775	748,362	2	1	y6
7	DAVITYTEHAK	567,775	849,410	2	1	y7
7	DAVITYTEHAK	567,775	474,743	2	2	y8

Tabla 5. Péptidos y transiciones de ejemplo monitoreados para H2A.

SEQ ID NO	Secuencia peptídica	Precursor m/z	Fragmento m/z	Estado de carga del precursor	Estado de carga del fragmento	Tipo iónico del fragmento
24	AGLQFPVGR	472,769	428,261	2	1	y4
24	AGLQFPVGR	472,769	575,330	2	1	y5
24	AGLQFPVGR	472,769	703,388	2	1	y6
24	AGLQFPVGR	472,769	816,472	2	1	y7
24	AGLQFPVGR	472,769	408,740	2	2	y7

5	28	HLQLAIR	425,767	472,324	2	1	y4
	28	HLQLAIR	425,767	600,382	2	1	y5
	28	HLQLAIR	425,767	713,466	2	1	y6
	28	HLQLAIR	425,767	563,330	2	1	b4
10	29	NDEELNK	431,201	503,282	2	1	y4
	29	NDEELNK	431,201	632,325	2	1	y5
	29	NDEELNK	431,201	747,351	2	1	y6
	29	NDEELNK	431,201	601,246	2	1	b4
15	30	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK	644,394	470,333	3	1	y4
	30	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK	644,394	1205,761	3	1	y11
	30	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK	644,394	1361,851	3	1	y13
	30	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK	644,394	435,615	3	3	y12

B. Análisis de MS

El análisis por SRM/MRM se realizó de manera que la cantidad del péptido del fragmento de las proteínas histonas que se detecta, como una función del área única del pico de la firma por SRM/MRM de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, indique tanto la cantidad relativa como la absoluta de la proteína en una muestra particular.

Ejemplo 8: Generación de curvas de calibración para evaluar la sensibilidad

Se introdujo una cantidad constante de péptido ligero encima del analito endógeno para crear un estándar interno y se introdujeron cantidades variables de péptido pesado para crear un conjunto de estándares de concentración. Debido a que una cantidad desconocida de analito endógeno no contribuye a la variación de la señal peptídica pesada utilizada para crear la curva, es posible determinar los valores del límite de cuantificación (LOQ), refiriéndose al punto en que las mediciones se vuelven cuantitativamente significativas. La respuesta del analito en este LOQ es identificable, discreta y reproducible con una precisión del 20 % y una exactitud del 80-120 %.

Las curvas de calibración inversas se crearon con un conjunto de muestras de plasma como matriz de fondo. Cada punto en la curva de calibración (y cada muestra analizada) incluía 100 fmoles de péptidos con marcaje pesados. La cantidad de matriz de fondo en la columna fue de 20 µg para cada punto en la curva de calibración, así como en todas las muestras analizadas. Se introdujeron péptidos pesados estándar (lisina o arginina C-terminal de péptidos marcados isotópicamente sintetizados químicamente y purificados >95 % de pureza de péptido, >99 % de pureza isotópica por Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Alemania, o New England Peptide Inc, Gardner, MA, EE. UU.) después de la digestión. Además, todas las muestras se llevaron a una disolución de 1 µg/mL de glucagón en agua/FA al 0,2 % para minimizar la unión a las superficies plásticas.

La Figura 10 ilustra una curva de calibración del péptido VFLENVIR (SEQ ID NO: 4) de la histona H4. La cantidad constante de péptido ligero obtenida de la digestión de la H4 recombinante, y la cantidad variable del péptido pesado correspondiente se introducen para crear un conjunto de estándares de concentración.

Ejemplo 9: Cuantificación relativa por rSRM en conjunto de datos humanos

El análisis de SRM/MRM se realizó de modo que la cantidad del péptido del fragmento de las proteínas histonas que se detecta, como una función del área única del pico de la firma por SRM/MRM de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, indique tanto la cantidad relativa como la absoluta de la proteína en un lisado proteico particular.

La cuantificación relativa por rSRM se puede lograr mediante:

1. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de las proteínas histonas mediante la comparación del área del pico de la firma por SRM de un péptido de histona determinado, detectado en una muestra biológica con la misma área del pico de la firma por SRM del mismo péptido del fragmento de histona en al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas
2. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de las proteínas histonas mediante la comparación el área del pico de la firma por SRM de un péptido de histona determinado detectado en una muestra biológica con las áreas del pico de las firmas por SRM desarrolladas a partir de péptidos de fragmentos de otras proteínas, en otras

muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área del pico de la firma por SRM entre las 2 muestras para un fragmento peptídico se normaliza, por ejemplo, para la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

3. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de las proteínas histonas mediante la comparación el área del pico de la firma por SRM para un péptido de histona determinado con las áreas del pico de las firmas por SRM de otros péptidos de fragmentos derivados de diferentes proteínas dentro de la misma muestra biológica con el fin de normalizar los niveles variables de las proteínas histonas a niveles de otras proteínas que no varían sus niveles de expresión bajo diversas condiciones celulares.

4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a péptidos de fragmentos no modificados como a péptidos de fragmentos modificados de las proteínas histonas, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glicosilación, acetilación, metilación (mono, di, tri), citrulinación, ubiquitinilación y sumoilación y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera como se determinan las cantidades relativas de los péptidos no modificados.

La cuantificación relativa por rSRM se logró mediante la determinación del aumento o la disminución de la presencia de las proteínas histonas mediante la comparación del área del pico de la firma por SRM de un péptido de histona determinado detectado en una muestra biológica con la misma área del pico de la firma por SRM del mismo péptido del fragmento de histona en al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas; véase la Figura 9.

La cuantificación absoluta de un péptido determinado se puede lograr mediante:

La comparación del área del pico de la firma por SRM/MRM para un péptido del fragmento dado de las proteínas histonas en una muestra biológica individual con el área del pico de la firma por SRM/MRM de un pico estándar de fragmento interno introducido en el lisado de proteína de la muestra biológica.

El estándar interno puede ser una versión sintética marcada del péptido del fragmento de las proteínas histonas que se está investigando o la proteína recombinante marcada. Este estándar se introduce en una muestra en cantidades conocidas antes (obligatorio para la proteína recombinante) o después de la digestión, y el área del pico de la firma por SRM/MRM se puede determinar tanto para el estándar de péptido del fragmento interno como para el péptido del fragmento nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de ambas áreas del pico.

Esto se puede aplicar a péptidos de fragmentos no modificados y péptidos de fragmentos modificados, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glicosilación, acetilación, metilación (mono, di, tri), citrulinación, ubiquitinilación y donde los niveles absolutos de los péptidos modificados pueden determinarse de la misma manera como se determinan los niveles absolutos de los péptidos no modificados.

La Figura 8 muestra el resultado de las concentraciones de la histona H4 determinadas en muestras de suero de 20 voluntarios sanos y 29 muestras de pacientes que sufren sepsis por la medición por SRM del péptido VFLENVIR (SEQ ID NO: 4).

Listado de Secuencias

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

<120> Proteínas histonas libres como biomarcadores

<130> X3493 PCT BLN

<150> EP15155599.2

<151> 2015-02-18

<150> US62/114,300

<151> 2015-02-10

<160> 41

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de histona H4 humana, ID de uniprot P62805.2, no se incluye la metionina inicial

<400> 1

```

5      Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
      1          5          10          15
      Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys Pro
          20          25          30
      Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser Gly
          35          40          45
10     Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu Asn
          50          55          60
      Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys Thr
      65          70          75          80
      Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr
          85          90          95
15     Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
          100

```

<210> 2

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos 46-102 de la SEQ ID NO: 1

<400> 2

```

30     Ile Ser Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe
      1          5          10          15
      Leu Glu Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys
          20          25          30
      Arg Lys Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln
          35          40          45
35     Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
          50          55

```

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos 46-55 de la SEQ ID NO: 1

<400> 3

```

      Ile Ser Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg
      1          5          10

```

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos 60-67 de la SEQ ID NO: 1

<400> 4

```

60     Val Phe Leu Glu Asn Val Ile Arg
          1          5

```

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos 80-91 con K90 acetilada de la SEQ ID NO: 1

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> 12
<223> ACETILACIÓN

10 <400> 5

	Thr	Val	Thr	Ala	Met	Asp	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys
	1				5					10		

15 <210> 6
<211> 12
<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos 24-35 de la SEQ ID NO: 1

25 <400> 6

	Asp	Asn	Ile	Gln	Gly	Ile	Thr	Lys	Pro	Ala	Ile	Arg
	1				5					10		

30 <210> 7
<211> 10
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> secuencia de aminoácidos 68-77 de la SEQ ID NO: 1

<400> 7

	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr	Thr	Glu	His	Ala	Lys
	1				5					10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de H4-GR-17, posición 2-17 de la SEQ ID NO:1

50 <400> 8

	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Leu	Gly	Lys	Gly	Gly	Ala	Lys	Arg
	1				5				10					15		

55 <210> 9
<211> 17
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de H4-GH-18, posición 2-18 de la SEQ ID NO:1

<400> 9

65

ES 2 800 848 T3

Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg
 1 5 10 15
 His

5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-LI-9, posición 22-30 de la SEQ ID NO:1

15 <400> 10

Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr
 1 5

20

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-LR-15, posición 22-35 de la SEQ ID NO:1

<400> 11

30

Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys Pro Ala Ile Arg
 1 5 10

<210> 12
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-LL-17, posición 22-37 de la SEQ ID NO:1

40

<400> 12

Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys Pro Ala Ile Arg Arg Leu
 1 5 10 15

45

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-PR-15, posición 32-45 de la SEQ ID NO:1

<400> 13

55

Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg
 1 5 10

60

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 65 <223> secuencia de aminoácidos de H4-PS-17, posición 32-47 de la SEQ ID NO:1

ES 2 800 848 T3

<400> 14
 Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
 1 5 10 15
 5
 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-EE-13, posición 52-63 de la SEQ ID NO:1
 15
 Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu
 1 5 10
 20
 <210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-EN-14, posición 52-64 de la SEQ ID NO:1
 30
 Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu Asn
 1 5 10
 35
 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-RR-13, posición 67-78 de la SEQ ID NO:1
 45
 <400> 17
 Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg
 1 5 10
 50
 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4- RK-14, posición 67-79 de la SEQ ID NO:1
 <400> 18
 Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys
 1 5 10
 60
 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-TK-13, posición 80-91 de la SEQ ID NO:1
 <400> 19

ES 2 800 848 T3

Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys
 1 5 10

5 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-TR-14, posición 80-92 de la SEQ ID NO:1

<400> 20

Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg
 1 5 10

15

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-RG-9, posición 92-99 de la SEQ ID NO:1

25 <400> 21

Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
 1 5

30 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de H4-RG-12, posición 92-102 de la SEQ ID NO:1

<400> 22

Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
 1 5 10

40

<210> 23
 <211> 130
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de histona H2A humana de tipo 1, ID de uniprot Q96QV6, no se incluye la metionina inicial

50

<400> 23

55

60

65

5 Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ser Lys Ser
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Ile His Arg
 20 25 30
 10 Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ala Glu Arg Ile Gly Ala Gly Ala Pro
 35 40 45
 Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu Glu
 50 55 60
 Leu Ala Gly Asn Ala Ser Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile Pro
 15 65 70 75 80
 Arg His Leu Gln Leu Ala Ile Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys Leu
 85 90 95
 Leu Gly Gly Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile Gln
 100 105 110
 15 Ala Val Leu Leu Pro Lys Lys Thr Glu Ser His His His Lys Ala Gln
 115 120 125
 Ser Lys
 130

20 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de HA-AR-10, posición 21-29 de la SEQ ID NO:23
 <400> 24

30 Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg
 1 5

35 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de HA-AH-12, posición 21-31 de la SEQ ID NO:23
 <400> 25

 Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Ile His
 1 5 10

45 <210> 26
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de HA-IL-23, posición 30-51 de la SEQ ID NO:23
 <400> 26

55 Ile His Arg Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ala Glu Arg Ile Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Pro Val Tyr Leu
 20

60 <210> 27
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 800 848 T3

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de HA-IA-25, posición 30-53 de la SEQ ID NO:23

<400> 27

5 Ile His Arg Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ala Glu Arg Ile Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Pro Val Tyr Leu Ala Ala
 20

10 <210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> secuencia de aminoácidos 82-88 de la SEQ ID NO:23

<400> 28

20 His Leu Gln Leu Ala Ile Arg
 1 5

<210> 29

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos 89-95 de la SEQ ID NO:23

30 <400> 29

Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys
1 5

35 <210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> secuencia de aminoácidos 100-118 de la SEQ ID NO:23

<400> 30

45 Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile Gln Ala Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Lys

50 <210> 31

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de histona H2B humana, ID de uniprot P62807

<400> 31

60 <210> 32

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

65 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de histona H2B humana, ID de uniprot P62807

<400> 32

5 Met Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys
1 5 10 15
Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg
20 25 30
Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
35 40 45
Val His Pro Asp Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Gly Ile Met Asn
50 55 60
10 Ser Phe Val Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Ala Ser Arg
65 70 75 80
Leu Ala His Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln
85 90 95
Thr Ala Val Arg Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val
100 105 110
15 Ser Glu Gly Thr Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys
115 120 125

20 <210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> secuencia de aminoácidos 94-100 de la SEQ ID NO: 31

<400> 32

30 Glu Ile Gln Thr Ala Val Arg
1 5

<210> 33
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos 101-109 de la SEQ ID NO: 31
40 <400> 33

Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys
1 5

45 <210> 34
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de histona H2B humana, ID de uniprot Q6DN03.3, no se incluye la metionina inicial

55 <400> 34

60

65

5 Met Pro Glu Pro Ala Lys Phe Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys
1 5 10 15
Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg
20 25 30
Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Ile Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Arg
35 40 45
Val His Pro Asp Thr Gly Ile Trp Cys Lys Ala Met Gly Ile Met Asn
50 55 60
10 Ser Phe Leu Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Ala Ser Arg
65 70 75 80
Leu Ala His Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Arg Ser Arg
85 90 95

15 Arg Pro Cys Ala Cys Cys Cys Pro Ala Ser Trp Pro Ser Thr Pro Cys
100 105 110
Pro Arg Ala Pro Arg Arg Ser Pro Ser Thr Pro Ala Pro Ser Glu Ser
115 120 125
Leu Pro Gly Pro Gly Ala Arg Ser Leu Pro Pro Ser Leu Pro Pro Arg
130 135 140
20 Val Ala Gly Cys Phe Val Ser Lys Gly Ser Phe Gln Gly His Leu Thr
145 150 155 160
Thr Ser Val Lys Glu Ser Phe Leu Cys Cys Gln Ser Gln Leu Met Phe
165 170 175
25 Leu Ala Ser Arg Leu Val Asn Phe Arg Arg Ala His Asn Thr Lys His
180 185 190
Arg

<210> 35
<211> 13
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos 181-193 de la SEQ ID NO: 34

<400> 35

Leu Val Asn Phe Arg Arg Ala His Asn Thr Lys His Arg
1 5 10

<210> 36
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de histona H3.1 humana, ID de uniprot P68431.2, no se incluye la metionina inicial

<400> 36

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15
Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr
20 25 30
Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly Thr Val Ala Leu
35 40 45
55 Arg Glu Ile Arg Arg Tyr Gln Lys Ser Thr Glu Leu Leu Ile Arg Lys
50 55 60
Leu Pro Phe Gln Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr
65 70 75 80
Asp Leu Arg Phe Gln Ser Ser Ala Val Met Ala Leu Gln Glu Ala Cys
85 90 95
60 Glu Ala Tyr Leu Val Gly Leu Phe Glu Asp Thr Asn Leu Cys Ala Ile
100 105 110
His Ala Lys Arg Val Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg
115 120 125
Arg Ile Arg Gly Glu Arg Ala
130 135

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos 57-63 de la SEQ ID NO: 36

 10 <400> 37

 Ser Thr Glu Leu Leu Ile Arg
 1 5

 15 <210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos 117-122 de la SEQ ID NO: 36

 <400> 38

 Val Thr Ile Met Pro Lys
 1 5

 25

 <210> 39
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos 41-49 de la SEQ ID NO: 36
 35
 <400> 39

 Tyr Arg Pro Gly Thr Val Ala Leu Arg
 1 5

 40
 <210> 40
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de histona H2A humana de tipo 3, ID de uniprot Q7L7L0.3, no se incluye la metionina inicial, H2A SRP0406 recombinante de Sigma
 50 <400> 40

 Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys Ser
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His Arg
 20 25 30
 55 Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ser Glu Arg Val Gly Ala Gly Ala Pro
 35 40 45
 Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu Glu
 50 55 60
 Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Arg His Leu Gln Leu Ala Ile Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys Leu
 85 90 95
 Leu Gly Arg Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile Gln
 100 105 110
 Ala Val Leu Leu Pro Lys Lys Thr Glu Ser His His Lys Ala Lys Gly
 115 120 125
 65 Lys

<210> 41

<211> 193

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de histona H1 humana, ID de uniprot P07305, no se incluye la metionina inicial

10 <400> 41

	Thr	Glu	Asn	Ser	Thr	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Lys	Pro	Lys	Arg	Ala	Lys
	1				5					10					15	
	Ala	Ser	Lys	Lys	Ser	Thr	Asp	His	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asp	Met	Ile	Val
				20					25					30		
15	Ala	Ala	Ile	Gln	Ala	Glu	Lys	Asn	Arg	Ala	Gly	Ser	Ser	Arg	Gln	Ser
			35					40					45			
	Ile	Gln	Lys	Tyr	Ile	Lys	Ser	His	Tyr	Lys	Val	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp
	50						55					60				
	Ser	Gln	Ile	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	Arg	Leu	Val	Thr	Thr	Gly	Val	Leu
20	65					70					75				80	
	Lys	Gln	Thr	Lys	Gly	Val	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Phe	Arg	Leu	Ala	Lys
					85					90				95		
	Ser	Asp	Glu	Pro	Lys	Lys	Ser	Val	Ala	Phe	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Glu
				100					105					110		
25	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Thr	Pro	Lys	Lys	Ala	Ser	Lys	Pro	Lys	Lys	Ala
			115					120					125			
	Ala	Ser	Lys	Ala	Pro	Thr	Lys	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Pro	Val	Lys	Lys
	130						135					140				
	Ala	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Ala	Thr	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys	Lys	Pro	Lys
	145					150					155				160	
30	Thr	Val	Lys	Ala	Lys	Pro	Val	Lys	Ala	Ser	Lys	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys
					165					170					175	
	Pro	Val	Lys	Pro	Lys	Ala	Lys	Ser	Ser	Ala	Lys	Arg	Ala	Gly	Lys	Lys
				180					185					190		
35	Lys															

40

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos y/o control de la terapia de una enfermedad o afección médica, que comprende detectar una proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma en una muestra biológica de un sujeto, en donde la presencia de dicha proteína histona libre o el fragmento de la misma es indicativa de dicha enfermedad o afección médica, en donde la proteína histona libre o un fragmento peptídico de la misma es la histona H4, y en donde se detecta un epítipo o un fragmento peptídico en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la histona H4 libre de acuerdo con la SEQ ID NO:1, y en donde el epítipo o el fragmento peptídico no es accesible cuando la proteína histona se ensambla en un nucleosoma.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método es un método de inmunoensayo que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto la muestra con
 - (i) un primer anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un primer epítipo de la proteína histona libre y
 - (ii) un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un segundo epítipo de la proteína histona libre,
 - b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la proteína histona libre, en donde el primer epítipo y/o segundo epítipo son epítipos de la histona H4 presentes en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 102 de la SEQ ID NO:1.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el primer epítipo está presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 30 de la SEQ ID NO:1, o los residuos 67 a 78 de la SEQ ID NO:1, o los residuos 92 a 102 de la SEQ ID NO:1 y/o el segundo epítipo está presente en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 46 a 102 de la SEQ ID NO:1.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína histona libre o fragmento peptídico de la misma se detecta por espectrometría de masas (MS).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el método de análisis por MS es monitorización de la reacción (SRM), monitorización de la reacción múltiple (MRM) o monitorización de la reacción paralela (PRM).
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que comprende las etapas de
 - a) someter la muestra a una digestión trípica; y
 - b) separar la muestra con un método cromatográfico antes del análisis por MS y después de la digestión trípica.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde se detecta y cuantifica al menos un fragmento peptídico del mismo seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 y 7.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enfermedad o afección médica se selecciona de enfermedades y afecciones médicas que implican una respuesta inflamatoria relacionada con etiologías infecciosas y no infecciosas tales como SIRS no infecciosa, sepsis bacteriana, viral, fúngica, sepsis grave, choque séptico, peritonitis, lesiones relacionadas con traumas, que incluyen hemorragia y/o lesión tisular, lesiones por quemaduras, pancreatitis aguda, lesión por isquemia-reperfusión, infarto de miocardio, choque cardiogénico, accidente cerebrovascular, envenenamiento agudo, tromboembolismo, así como también procedimientos de intervención tales como derivación cardiopulmonar y terapias tumorales.

Figura 1

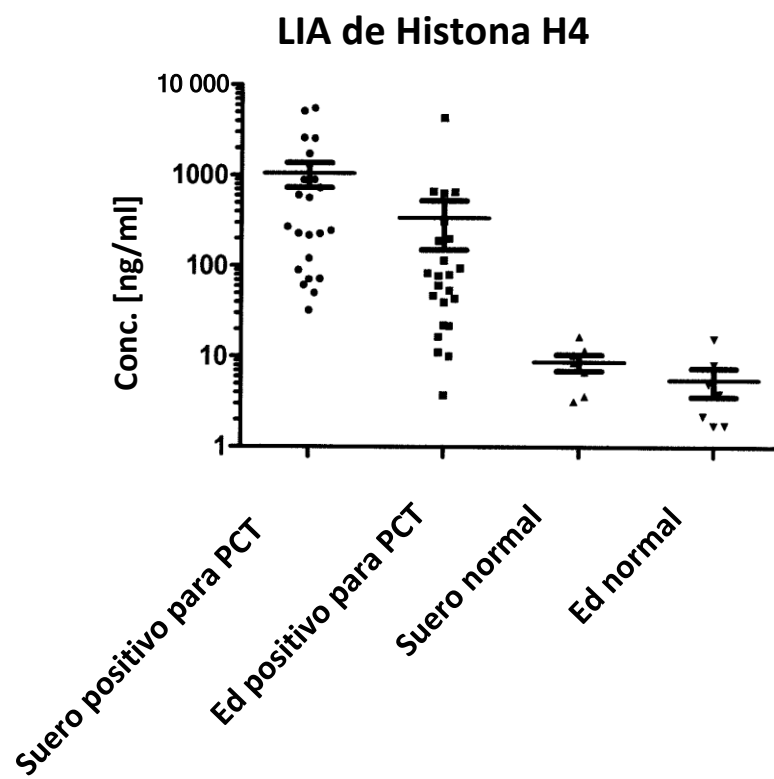


Figura 2

histona H4 en muestras de suero

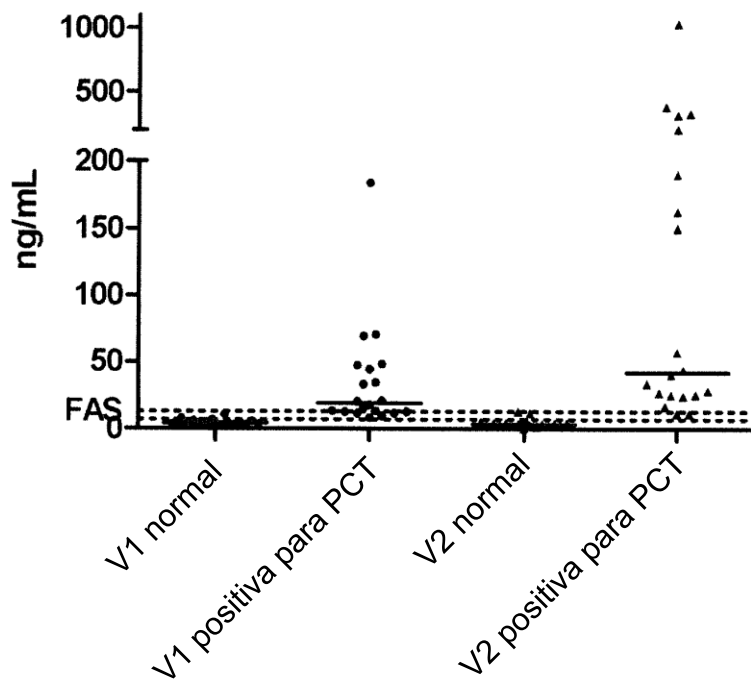


Figura 3

Correlación de histona H4 LIAV1 vs V2

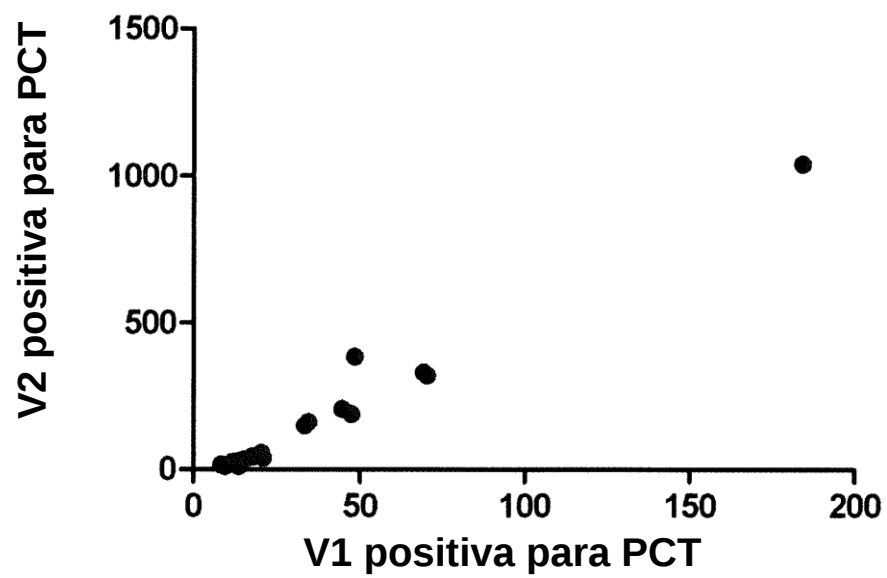


Figura 4

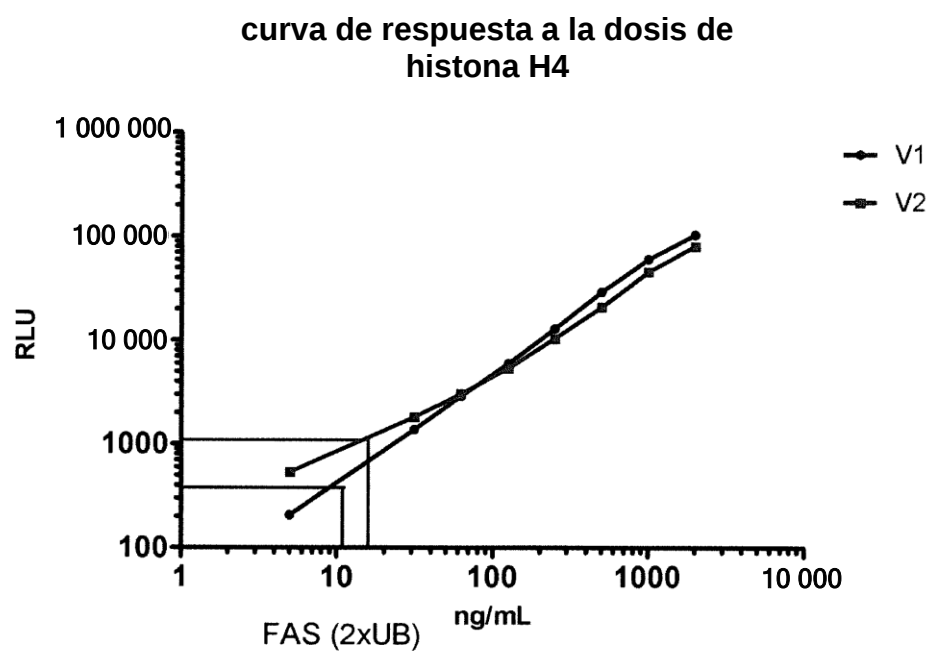


Figura 5

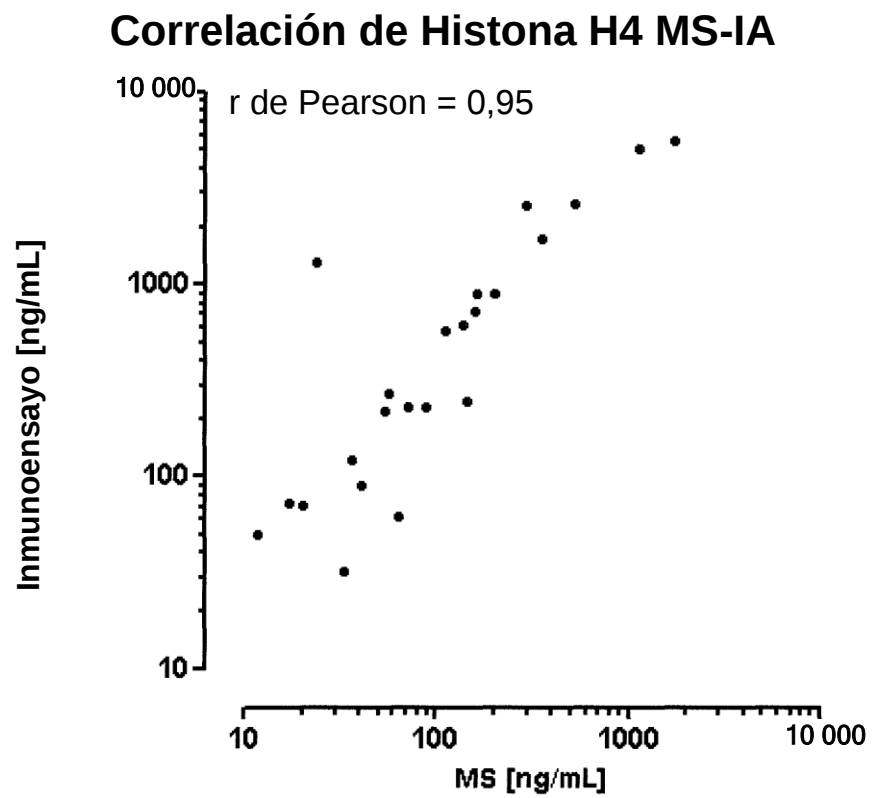


Figura 6

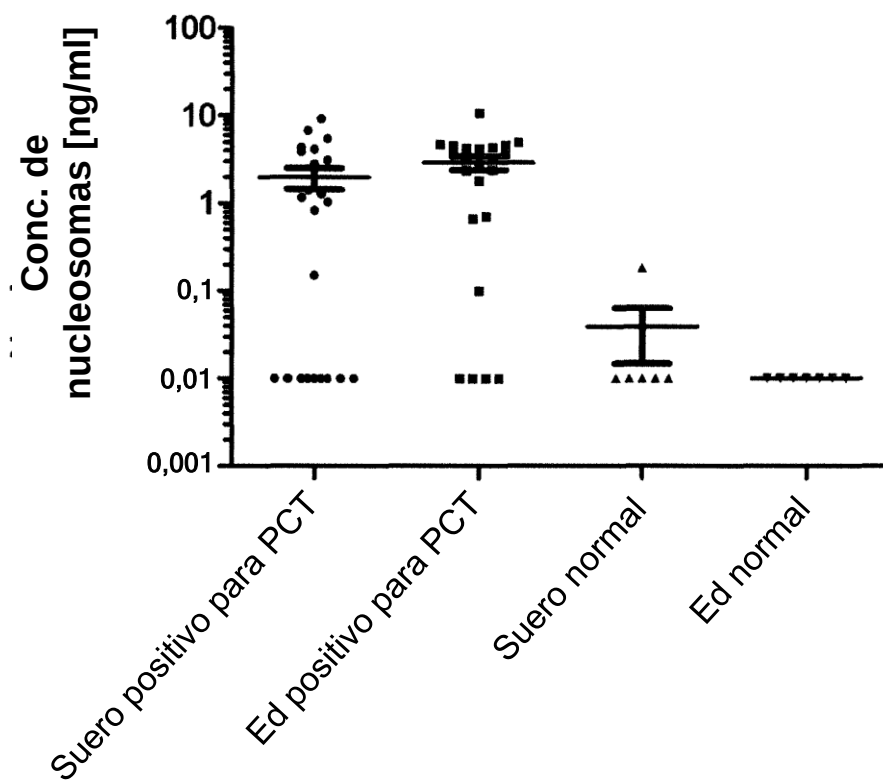


Figura 7

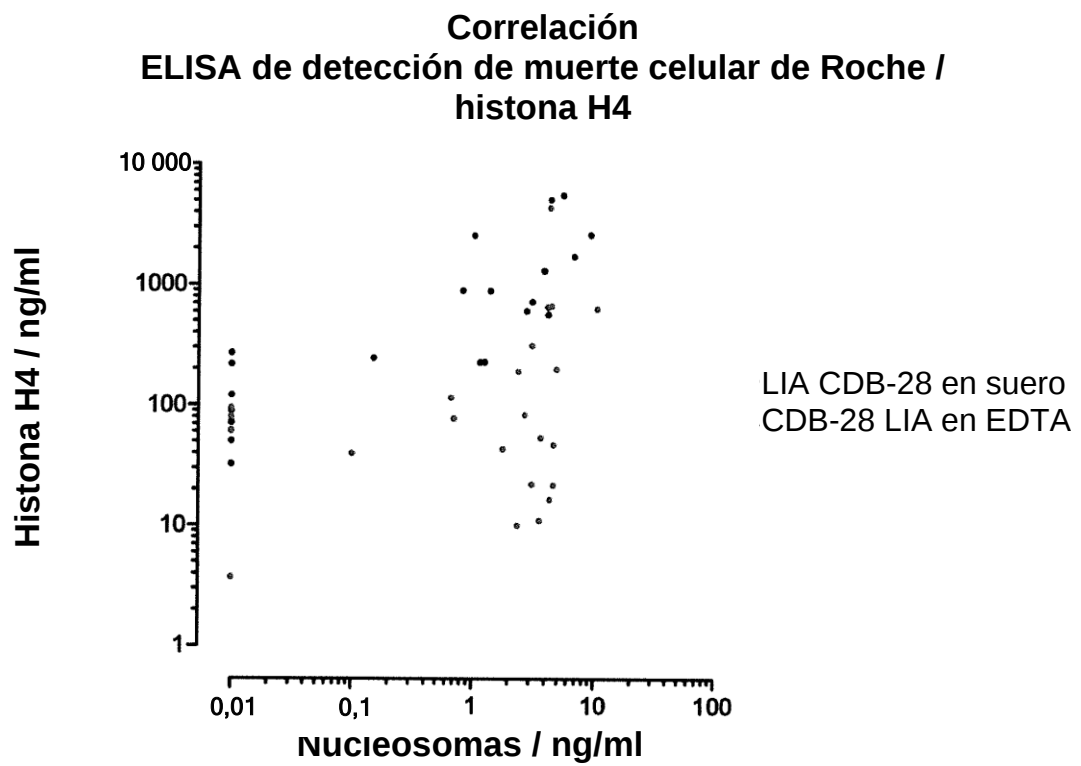


Figura 8

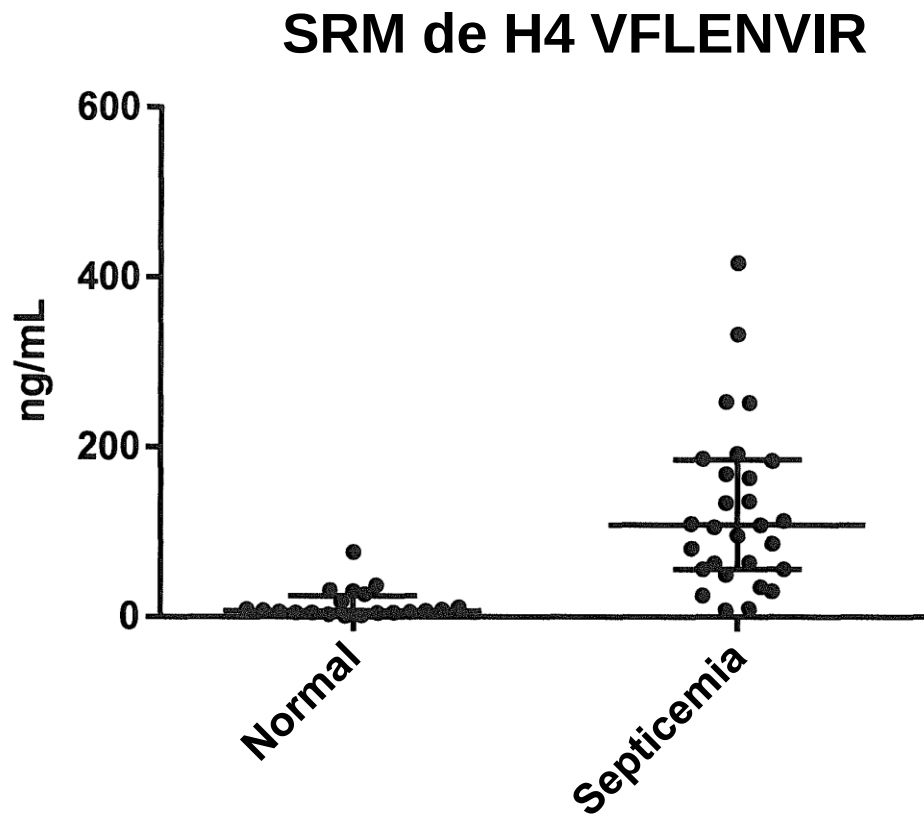


Figura 9

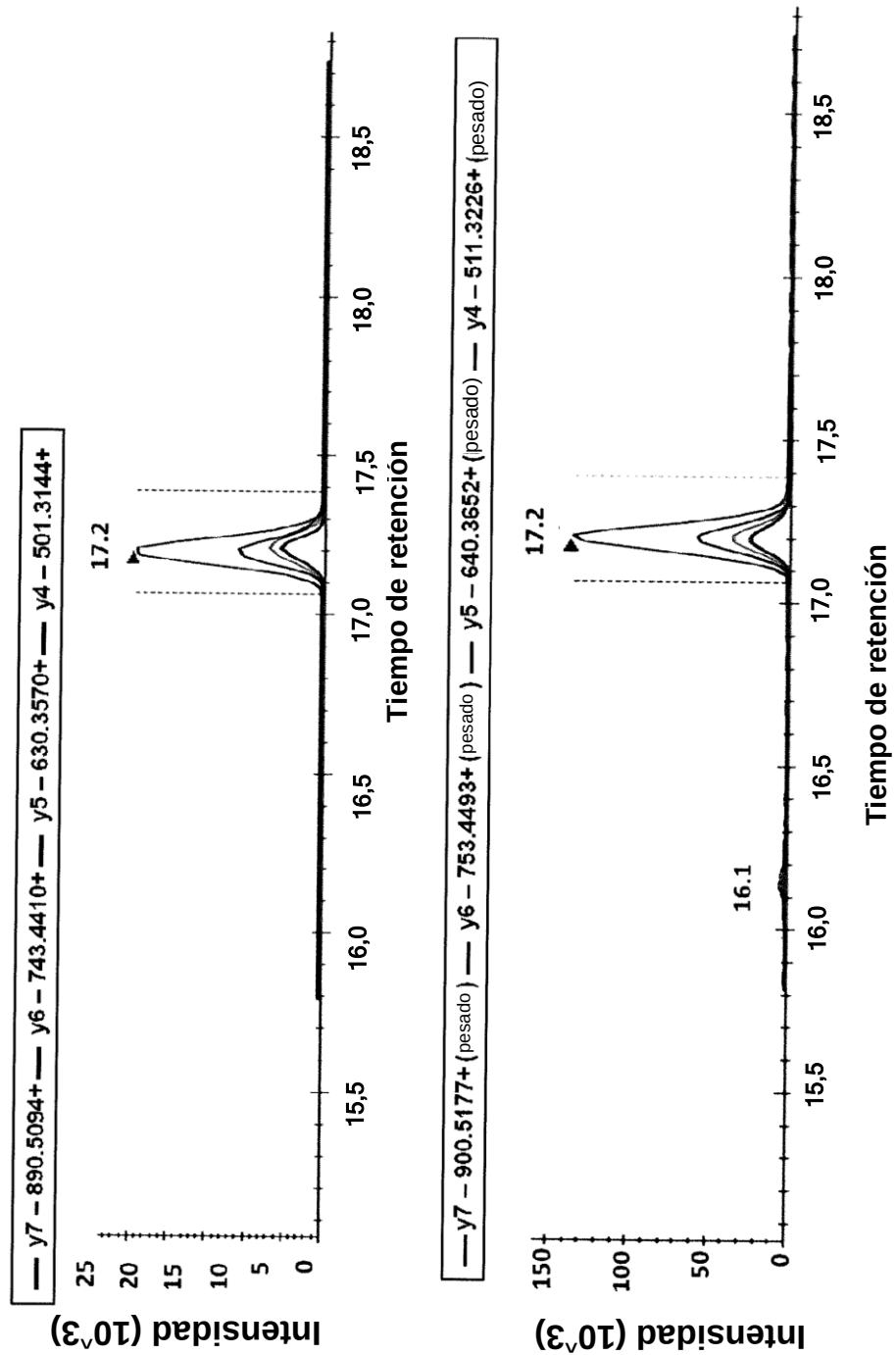


Figura 10

