



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 063**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06723243 .9**
96 Fecha de presentación : **06.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1856538**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Determinación de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4) como biomarcador para inflamaciones e infecciones.**

30 Prioridad: **11.03.2005 DE 10 2005 011 421**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2009

73 Titular/es: **BRAHMS Aktiengesellschaft**
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es: **Bergmann, Andreas;**
Struck, Joachim y
Ühlein, Monika

74 Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 327 063 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

Determinación de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4) como biomarcador para inflamaciones e infecciones.

La presente invención se refiere a procedimientos para la detección diagnóstica y para la prognosis evolutiva así como para el control evolutivo y terapéutico de inflamaciones e infecciones en los cuales se determina un biomarcador de nuevo tipo para las indicaciones indicadas. La invención se refiere en particular a procedimientos de la clase mencionada en los cuales las inflamaciones e infecciones diagnosticadas son parte de la compleja evolución de una morbilidad séptica (inflamaciones sistémicas de etiología infecciosa; sepsis).

En la siguiente descripción, conceptos tales como “diagnosis” o “diagnóstico(a)” se usan fundamentalmente como conceptos generales simplificados que, cuando no se desprenda otra cosa del contexto, se entenderá que incluyen también la diagnosis diferencial más especializada y las aplicaciones para la prognosis/prognosis anticipada y el control evolutivo y terapéutico de las afecciones sobre las que se trate.

La presente invención tiene su punto de partida en los intensivos trabajos de investigación de la solicitante en relación con adicionales perfeccionamientos de la diagnosis y la terapia de la sepsis.

Entre la sepsis y las inflamaciones existe en el plano científico una relación objetiva y definitoria. Se designan como inflamaciones (reacciones inflamatorias) por completo en general determinadas reacciones fisiológicas de protección de un organismo a ataques externos de distintas clases, como p. ej. lesiones, quemaduras, alérgenos, infecciones por microorganismos tales como bacterias y hongos y virus, a tejidos foráneos que provocan reacciones de rechazo, o a determinados estados inflamatorios endógenos del cuerpo, p. ej. en el caso de las afecciones autoinmunes y del cáncer.

Cuando las inflamaciones son parte de una reacción mal encaminada del cuerpo a determinados procesos endógenos, tal como p. ej. sucede en el caso de las afecciones autoinmunes, y/o son de naturaleza crónica, o cuando las mismas alcanzan proporciones sistémicas, como sucede en el caso del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) o como sucede en el caso de una sepsis severa debida a causas infecciosas, las inflamaciones pueden devenir auténticas morbilidades que cuando los procesos fisiológicos típicos de las reacciones inflamatorias quedan fuera de control, como sucede en el caso del SIRS y de la sepsis, pueden incluso llegar a constituir una aguda amenaza para la vida.

En las inflamaciones sistémicas como las que se dan en el caso de una sepsis o del shock séptico, las cascadas de reacciones inflamatorio-específicas se propagan de manera incontrolada a todo el cuerpo y llegan además a constituir una amenaza para la vida, en el sentido de una excesiva respuesta inmune. Con respecto a los conocimientos actuales acerca de la aparición de distintos grupos de sustancias endógenas inflamatorio-específicas y del posible papel desempeñado por las mismas se hace por ejemplo referencia a A. Beishuizen *et al.*, “Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock”, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 33, 1999, 55-131, y a C. Gabay *et al.*, “Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation”, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 340, N° 6, 1999, 448-454. Puesto que la comprensión de la sepsis, y con la misma también las definiciones reconocidas, han ido cambiando y afinándose en los últimos años, se hace además referencia a K. Reinhart *et al.*, “Sepsis und septischer Schock”, en: *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. New York, 2001, 756-760, donde se da una definición moderna del concepto de la sepsis, así como en particular también a Mitchell M. Levy *et al.*, “2001 SCCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference”, en: *Crit Care Med* 2003, Vol. 31, N° 4, 1250-1256. Con respecto al significado del cuadro morbo de la “sepsis severa” se hace además referencia a Niels C. Riedemann *et al.*, *The enigma of sepsis*, *J. Clin. Invest.* 112:460-467 (2003). Se encuentra también en <http://www.talessin.de/scripse/medizin/sepsis1.html>. un resumen más reciente de los criterios y definiciones para una sepsis y los cuadros morbosos estrechamente emparentados con la misma. Dentro del marco de la presente solicitud, el concepto de la “sepsis” se usa en un sentido amplio que engloba en particular a la sepsis, a la sepsis severa y al shock séptico, de acuerdo con las definiciones que pueden sacarse de las publicaciones mencionadas, para cuadros morbosos sépticos de pacientes gravemente enfermos en estaciones de cuidados intensivos.

Mientras que al menos en el ámbito europeo la infección bacteriana sistémica detectable mediante un hemocultivo positivo acuñó durante mucho tiempo el concepto de la sepsis, hoy en día la sepsis se entiende en primera línea como inflamación sistémica que tiene causas infecciosas, pero que como morbilidad presenta grandes similitudes con inflamaciones sistémicas que son provocadas por otras causas.

Con la mencionada transformación de la comprensión de la sepsis están en correspondencia modificaciones de los planteamientos diagnósticos. Así, la determinación directa de agentes causales bacterianos fue sustituida o complementada por complejas supervisiones de parámetros de laboratorio y parámetros hemodinámicos usando los llamados sistemas Score asistidos por ordenador (como p. ej. el APACHE II SCORE; significando APACHE “Acute Physiology and Chronic Health Evaluation”; véase G. Pilz *et al.*, *Krankenpflege-Journal* 29 (1991), pp. 483-492 o la introducción de la patente DE 42 27 454 C1), así como más recientemente en particular también por la detección de determinadas sustancias endógenas que participan en la aparición de sepsis o en la aparición de inflamación, es decir, de “biomarcadores” específicos.

De entre el gran número de mediadores y proteínas de fase aguda son en particular adecuados con finalidades diagnósticas aquéllos cuya aparición es muy específica de la sepsis o de determinadas fases de una sepsis, cuyas concentraciones varían drástica y significativamente desde el punto de vista diagnóstico, y que además presentan, en particular también *ex vivo*, las estabildades necesarias para las determinaciones rutinarias y alcanzan altos valores de concentración. A efectos diagnósticos está en primer plano la fiable correlación de la morbilidad (sepsis) con el respectivo biomarcador, sin que tenga siempre que ser conocido en detalle el papel desempeñado por el mismo en la compleja cascada de las sustancias endógenas que participan en la aparición de la sepsis. Hay sin embargo un creciente interés en determinar nuevos biomarcadores particulares que en el sentido de una “estratificación” permitan (también) efectuar una asignación de los pacientes de sepsis a grupos con causas de enfermedad emparentadas o a una similar y previsible evolución de la enfermedad, para que de entre las del espectro de las posibles medidas terapéuticas puedan aplicarse las más adecuadas. Puede hacerse complementariamente a este respecto referencia a John C. Marshall *et al.*, Crit Care Med 2003, Vol 31, N° 5, 1560-1567.

Una sustancia endógena establecida y particularmente adecuada como biomarcador de la sepsis es la procalcitonina (PCT). La procalcitonina es un prohormona cuyas concentraciones en suero bajo las condiciones de una inflamación sistémica de etiología infecciosa (sepsis) alcanzan valores muy altos, mientras que prácticamente no es detectable en los sujetos sanos. Además, en un estadio relativamente temprano de una sepsis se alcanzan altos valores de procalcitonina, con lo cual la determinación de procalcitonina es también adecuada para la detección temprana de una sepsis y para establecer una temprana distinción entre una sepsis de etiología infecciosa e inflamaciones severas debidas a otras causas. La determinación de procalcitonina como marcador de sepsis es objeto de la publicación de M. Assicot *et al.*, “High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection”, The Lancet, vol. 341, N° 8844, 1993, 515-518, y de las patentes DE 42 27 454 C2 y EP 0 656 121 B1 y US 5.639.617. Como complemento de la presente descripción se hace explícitamente referencia a las patentes mencionadas y a las anteriores referencias de la literatura que se enumeran en la publicación mencionada.

Una discusión actual del uso de biomarcadores, incluyendo el uso del biomarcador PTC, dentro del marco de la diagnosis de la sepsis se encuentra también en el estudio de Shawn D. Carrigan *et al.*, “Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis” en: Clinical Chemistry 50:8, agosto 2004, 1301-14.

La disponibilidad del marcador de sepsis procalcitonina ha dado fuertes impulsos a la investigación de la sepsis, y en la actualidad se hacen intensivos esfuerzos para encontrar adicionales biomarcadores que puedan complementar la determinación de procalcitonina y/o puedan proporcionar adicionales informaciones a efectos de diagnosis fina o de diagnosis diferencial o de estratificación.

La búsqueda de potenciales nuevos biomarcadores de sepsis se ve ciertamente dificultada por el hecho de que a menudo se sabe aún muy poco o nada sobre la función exacta o sobre los motivos exactos para la aparición de determinadas sustancias endógenas que participan en la aparición de sepsis.

Primeros resultados de la verificación experimental de un fructífero planteamiento puramente hipotético para la determinación de adicionales potenciales marcadores de sepsis se encuentran en los documentos DE 198 47 690 A1 y WO 00/22439 de la solicitante. Ahí se demuestra que en la sepsis no tan sólo está incrementada la concentración de prohormona procalcitonina, sino que pueden observarse concentraciones significativamente incrementadas también para otras sustancias que pueden contarse entre las prohormonas peptídicas o representan fragmentos de tales prohormonas y presentan una inmunorreactividad típica de tales prohormonas.

La presente solicitud es el resultado de otro fructífero planteamiento puramente experimental para la búsqueda de adicionales biomoléculas específicas de la sepsis. Este planteamiento se basa en que mediante la administración de una endotoxina o bien mediante infección con bacterias se provoca en primates (babuinos) un estado morboso que puede ser designado como sepsis artificial, y luego y mediante la comparación de los patrones de manchas de proteína de electroforesis en gel de babuinos tratados con endotoxina y no tratados se determinan sustancias endógenas de naturaleza peptídica o proteínica que se encuentran solamente en los babuinos “sépticos” y que por consiguiente representan potenciales biomarcadores específicos de sepsis. El modelo de primates fue elegido debido a la gran similitud de la fisiología de los primates y los humanos y a la alta reactividad cruzada con muchos reactivos terapéuticos y diagnósticos humanos.

Como se expone más exactamente en la parte experimental de anteriores solicitudes de patente de la solicitante, tras haber provocado experimentalmente una sepsis artificial en babuinos mediante administración de endotoxina (LPS de *Salmonella Typhimurium*) y reacondicionamiento electroforético en gel bidimensional de tejidos de los animales tratados se encuentra una cantidad de manchas de proteína identificables tan sólo en los animales tratados. Los productos proteínicos correspondientes a las manchas se aíslan del gel de electroforesis y se analizan por espectrometría de masas (ante todo mediante espectrometría de masas en tándem).

Según el procedimiento mencionado y como se describió por primera vez en anteriores solicitudes de patente alemana y europea de la solicitante, además de marcadores de sepsis sobre los que ya se ha tratado en la literatura se identificaron como marcadores de sepsis de nuevos tipos entre otros las proteínas “inflamina” (WO 02/085937), CHP (WO 03/005035), fragmentos de citoqueratina-1 solubles (sCY1F; WO 03/002600) y la proteína LASP-1 (WO 03/089934), así como en enzimas tales como aldosa-1-epimerasa (mutarotasa; WO 03/048780), glicina-N-aciltransferasa (GNAT; WO 03/048781) y carbamoilfosfato sintetasa 1 soluble (CPS 1; WO 03/089933). Está publicada en J.

Struck *et al.*, Immuno-analyse & biologie spécialisée 19 (2004) 131-137 una discusión del procedimiento de análisis proteómico empleado y de los resultados que se obtuvieron para un marcador de sepsis establecido recurriendo al procedimiento, que está en forma de un fragmento de la región central del precursor de la hormona ANP (péptido atrial natriurético).

5

Al haberse hecho explícitamente referencia a estas solicitudes y publicaciones, debe considerarse que queda incorporado a la exposición de la presente solicitud el contenido de las anteriores solicitudes mencionadas de la solicitante y de las correspondientes publicaciones mencionadas.

10 La presente invención se basa en que en una investigación de la clase anteriormente descrita usando extractos hepáticos de babuinos fue aislada una sustancia que se presenta solamente en los extractos de los babuinos tratados con LPS pero está ausente en el caso de los babuinos sanos, habiendo podido ser dicha sustancia identificada como SRL-alcohol deshidrogenasa (SCAD-SRL o DHRS4), como se aclara más detalladamente en la parte experimental.

15 Según ello, la presente invención se refiere según la reivindicación 1 en el sentido más amplio al uso de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4) como biomarcador humoral para la detección diagnóstica y para la prognosis evolutiva así como para el control evolutivo y terapéutico de inflamaciones e infecciones, y en particular de aquéllas que son parte de la compleja evolución de una morbilidad séptica.

20 Está descrito en la reivindicación 2 el uso diagnóstico preferido para la diagnosis de la sepsis *ex vivo*.

Las reivindicaciones 3 a 10 se refieren a procedimientos preferidos para la diagnosis de la sepsis y a sus configuraciones preferidas.

25 Como se describe más detalladamente en la parte experimental, en las investigaciones de la solicitante fue identificada una sustancia peptídica que pudo ser identificada como SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4).

30 La DHRS4 (“miembro 4 (de la familia SDR) de las deshidrogenasas/reductasas”, sinónimos: SCAD-SRL (“alcohol deshidrogenasa de cadena corta con la secuencia SRL C-terminal”), alcohol deshidrogenasa peroxisomal de cadena corta, entre otras) pertenece a una gran familia de oxidorreductasas NAD- o NADP-dependientes (familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR)) (1) (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00106>). Estas enzimas comprenden aproximadamente de 250 a 300 aminoácidos y están en la mayoría de los casos en forma de homodi- o -tetrámeros. Las SDRs típicamente contienen dos dominios: uno que fija la coenzima (NAD- o NADP), y otro que fija el sustrato, determina la especificidad de sustrato e interviene en la catálisis. No está documentada experimentalmente la especificidad de sustrato de la DHRS4 que aquí interesa. Debido a la similitud secuencial se presume sin embargo que la DHRS4 reduce el todo-trans-retinal y el 9-cis-retinal. Podrían ser otros sustratos alquilfenilcetona y compuestos alfa-dicarbonílicos con anillos aromáticos (tales como pirimidin-4-aldehído, 3-benzoilpiridina, 4-benzoilpiridina, menadiona y 4-hexanoilpiridina) (<http://us-expasy.org/cgibin/niceprot.pl?q9nv08>).

40 La DHRS4 es codificada por un gen en el cromosoma 14 (<http://genecards.bcgsc.bc.ca/cgi-bin/carddisp?DHRS4&search=dhrs4&suff=txt>). La secuencia de aminoácidos de la DHRS4 se ha sacado de la correspondiente secuencia de cDNA. En la literatura hay distintas interpretaciones con respecto a la zona N-terminal de la proteína. Así indican por ejemplo Clark *et al.* la secuencia que comprende 278 aminoácidos según la ID SEC N°:1 (2). Otros autores ven el comienzo de la proteína a partir de la metionina en la posición 18 de la secuencia según la ID SEC N°:1 (3).

45 Si se parte de la base de la variante más larga, en el extremo N-terminal puede identificarse una secuencia señal que podría señalar la secreción de la proteína (2). Los resultados de Fransen *et al.* más bien sugieren una localización peroxisomal que es señalizada por el tripéptido SRL C-terminal. Una estructura C-terminal de este tipo es conocida como PTS (secuencia de direccionamiento peroxisomal) (4).

La DHRS4 es evidentemente expresada en distintos tejidos/órganos (<http://genecards.bcgsc.bc.ca/cgi-bin/carddisp?DHRS4&search=dhrs4&suff=txt>).

55 Han sido además descritas distintas variantes alternativas de empalme para el gen de DHRS4: El NBCI (NCBI = (banco de datos del) Centro Nacional de Información Biotecnológica) prevé actualmente 30 distintos transcritos empalmados y correspondientemente 30 distintos productos de traducción (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=locusid&l=10901>). En el banco de datos SWISSPROT están ciertamente descritas tan sólo dos variantes adicionales.

60

En la WO 0153486 se prevén en la DHRS4 posibles sitios de glicosilación y miristoilización que por cierto no están documentados experimentalmente.

65 En la presente solicitud se entiende que la designación DHRS4 comprende además de proteínas mono- o multímeras según la ID SEC N°:1 también variantes de corte y empalme, así como fragmentos y variantes modificadas postraslacionalmente de otro modo, y en particular aquéllas que en los análisis que se describen a continuación presentan una inmunorreactividad correspondiente a la DHRS4.

ES 2 327 063 T3

En contextos patofisiológicos se expone en la WO 0153486 que entre otras la DHRS4 es sobreexpresada en determinadas células cancerosas y por consiguiente podría servir de punto de apoyo para la terapia del cáncer y la diagnosis a partir de muestras de tejido. No se establece sin embargo una relación con infecciones y morbilidades sépticas.

5 Esto sucede por vez primera en la presente solicitud, que se refiere en particular a la utilización de los nuevos conocimientos para la diagnosis *in vitro* (*ex vivo*).

En la WO 2004/003162 A2 se describe que en una biblioteca de cDNA fue sobre la base de un RNA del intestino delgado de una persona obesa de sexo femenino identificado un cDNA que codifica para un péptido de 244 aminoácidos que pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta.

En la solicitud US 2002/0160392 A1 se menciona la alcohol deshidrogenasa de cadena corta humana, sacada de un DNA aislado e identificado de células de hepatoblastoma y designada como PRO1800, en un contexto en el que se trata con preferencia de un potencial desarrollo de fármacos.

15 La determinación de DHRS4 con fines de diagnósticos en los fluidos biológicos se hace preferiblemente *ex vivo* con ayuda de procedimientos de determinación inmunodiagnóstica (ensayos de fijación de ligandos; inmunoensayos).

Se entiende además que, presuponiendo la necesaria especificidad y sensibilidad, pueden aplicarse cualesquiera ensayos de fijación de ligandos/inmunoensayos que operen según principios conocidos para la determinación cuantitativa o semicuantitativa de DHRS4 en fluidos biológicos, y en particular los de la circulación tales como el suero o el plasma.

En una forma de realización preferida el procedimiento se ejecuta como inmunoensayo heterogéneo en sándwich en el cual un primer anticuerpo que fija DHRS4 está inmovilizado en una fase fija cualquiera, como por ejemplo las paredes de tubitos de ensayo recubiertos (p. ej. de poliestireno; "Coated Tubes"; CT) o en placas de microtitulación, por ejemplo de poliestireno, o en partículas, como por ejemplo partículas magnéticas, mientras que otro anticuerpo específico para DHRS4 lleva un residuo que representa una etiqueta directamente detectable o permite un enlace selectivo con una etiqueta y sirve para la detección de las estructuras en sándwich formadas. Es también posible una inmovilización posterior o retardada en el tiempo usando adecuadas fases fijas.

Fundamentalmente pueden usarse todas las técnicas de marcación que son utilizables en los ensayos de la clase que se ha descrito, a las cuales pertenecen marcaciones con radioisótopos, enzimas y etiquetas de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia y marcaciones de color directamente detectables por vía óptica, como por ejemplo átomos de oro y partículas de colorante como las que se usan en particular para los llamados ensayos rápidos o ensayos de Point-of-Care (POC). Queda con ello dentro del marco de la presente invención el configurar el procedimiento según la invención también como ensayo rápido.

El procedimiento de determinación de DHRS4 puede además ejecutarse por ejemplo también usando un homogéneo procedimiento de detección en el que permanecen en suspensión en la fase líquida complejos en sándwich formados a base de dos anticuerpos y la DHRS4 a detectar. En un caso de este tipo se prefiere marcar ambos anticuerpos con partes de un sistema de detección que cuando ambos anticuerpos son integrados en un único sándwich permite una generación o emisión de señales. Tales técnicas son susceptibles de ser configuradas en particular como procedimientos de detección por amplificación o extinción de fluorescencia. Un procedimiento particularmente preferido de este tipo se refiere al uso de reactivos de detección que se aplican por parejas, como por ejemplo los que están descritos en los documentos US-A-4 822 733, EP-B1-180 492 o EP-B1-539 477 y en el estado de la técnica que ahí se cita. Los mismos permiten directamente en la mezcla de reacción una medición que comprende selectivamente tan sólo productos de reacción que contienen en un único inmunocomplejo ambos componentes de marcación. Como ejemplo se hace referencia a la tecnología que se oferta bajo las marcas TPACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) o KRYPTOR®, la cual lleva a la práctica las doctrinas de las solicitudes anteriormente mencionadas.

55 Pero también en el caso de los inmunoensayos heterogéneos en sándwich dos anticuerpos específicos para DHRS4 pueden presentar partes de un sistema de detección de la clase que acaba de ser descrita en relación con ensayos homogéneos.

Como se demuestra a continuación, la aparición - en el sentido de una expresión detectable - de DHRS4 en extractos hepáticos de babuinos está acoplada a una precedente estimulación por endotoxinas provocadora de "sepsis" o a una infección precedente. En consonancia con la literatura que se ha citado al comienzo, en los controles no tratados no es posible una detección de DHRS4. Con ello, la DHRS4 representa un potencial marcador de sepsis.

60 A continuación se aclara más detalladamente la invención haciendo referencia a siete figuras.

Las figuras muestran lo siguiente:

65 La Fig. 1: Partes ampliadas de gels bidimensionales que permiten establecer una comparación de los patrones de manchas de proteínas hepáticas solubles de un babuino sano (A) y de las proteínas hepáticas de un babuino 5 h después de una sepsis inducida mediante inyección de LPS (B). El círculo indica la posición del producto DHRS4 específico de sepsis según la invención.

La Fig. 2A: Resultados de una espectrometría de masas en tándem ESI-MS/MS de un fragmento peptídico seleccionado de la digestión con tripsina de la mancha de proteína específica de sepsis. Espectro de masa en tándem del ion precursor = 669,76. La interpretación del espectro redonda en la secuencia de aminoácidos A(K/Q)DGAHVV.

5 La Fig. 2B: Resultados de una espectrometría de masas en tándem ESI-MS/MS de un fragmento peptídico seleccionado de la digestión con tripsina de la mancha de proteína específica de sepsis. Espectro de masa en tándem del ion precursor = 814,44. La interpretación del espectro redonda en la secuencia de aminoácidos TASTDG(I/L)GS.

10 La Fig. 3: La secuencia de aminoácidos de DHRS4 (véase también la ID SEC N°:1). Están destacados los elementos estructurales de interés: Mediante comparación con las secuencias que se indican en Kallberg Y *et al.*, (2002) (15) y en Jörnvall H *et al.*, (1995) (1) fueron identificadas y están enmarcadas probables estructuras en hoja plegada β y hélices α . Mediante la misma comparación fueron identificados aminoácidos conservados a los que se ha puesto fondo sombreado. Para otros miembros de la familia SDR se ha descrito que los puntos de contacto para una multimerización son las zonas α 4(E) y α 5(F); Jörnvall H *et al.*; (1995) (1). El sitio de fijación para NAD/NADP es según comparación
15 secuencial con DHS2 (SWISSPROT inscripción Q13268) la zona de la Pos. 36-59. Las zonas de secuencia que fueron usadas como péptidos para la inmunización están indicadas con negrita y cursiva (Pos. 19-30, 209-228, 230-247, 256-278).

20 La Fig. 4: Una típica curva estándar del inmunoensayo en sándwich para DHRS4 utilizado en la presente solicitud en el Capítulo 5.1 para determinaciones (ensayo de quimioluminiscencia en el formato del tubo recubierto; anticuerpo contra las zonas Pos. 209-228 (péptido PLE20; fase fija) y 256-278 (péptido PSL23; indicador)). Sirvieron de patrones diluciones de extracto de *E. coli* con contenido de DHRS4 recombinante en suero de caballo normal a las cuales les fueron atribuidas unidades arbitrarias. Está indicada la sensibilidad funcional de ensayo de 2 U/l.

25 La Fig. 5: Inmunorreactividades de DHRS4 medidas con un ensayo según la Fig. 4, medidas en cada caso en 50 muestras de plasma de sujetos de ensayo sanos y de pacientes con sepsis. Está indicada para 2 U/l la sensibilidad funcional de ensayo.

30 La Fig. 6: Una comparación metodológica de distintos ensayos en sándwich para DHRS4: Fueron medidas muestras de plasma en distintos ensayos. Están indicados en los ejes los epítopes peptídicos de los anticuerpos usados en los ensayos. Los coeficientes de correlación son los siguientes: $r = 0,97$ (A), $r = 0,95$ (B), $r = 0,94$ (C).

35 La Fig. 7A: Una comparación de secuencias de DHRS4 (DHS4_HUMAN) con la secuencia DHS2_HUMAN (programa ClustalW). Los aminoácidos idénticos están marcados con asteriscos, y los aminoácidos estructuralmente emparentados están marcados con puntos. Están marcadas aquellas zonas de secuencia de DHRS4 que fueron sintetizadas como péptidos y usadas para la producción de anticuerpos.

40 La fig. 7B: Una comparación de secuencias de DHRS4 (DHS4_HUMAN) con dos variantes de corte y empalme identificadas en el banco de datos SWISSPROT (programa ClustalW). Los aminoácidos idénticos están identificados con asteriscos. Están marcadas aquellas zonas de secuencia de DHRS4 que fueron sintetizadas como péptidos y usadas para la producción de anticuerpos.

Resultados de los ensayos

45 1. *Simulación de infección mediante administración de endotoxina en el modelo animal (babuinos)*

Conforme a los ensayos efectuados con babuinos para la estimulación de la secreción de procalcitonina mediante inyecciones de endotoxina (5, 6) les fueron administrados por vía intravenosa a babuinos macho (*Papio ursinus*)
50 (de unos 2 años de edad y de pesos de 27 a 29 kg) en cada caso 100 μ g de LPS (lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium*, fuente de suministro: Sigma) por kg de peso corporal. Al haber transcurrido de 5 a 5,5 h después de la inyección, los animales fueron sacrificados mediante administración intravenosa de Doletal. Inmediatamente después de su exitus se procedió a preparar el hígado y estabilizarlo mediante congelación en nitrógeno líquido.

55 En el posterior procesamiento se procedió a mezclar muestras (de 1 g) de los hígados congelados bajo enfriamiento con nitrógeno con 1,5 ml de tampón A (Tris 50 mM/HCl, pH 7,1, KCl 100 mM, 20% de glicerol, Pefabloc 1 mM, cóctel inhibidor de proteasa "Complete" (Roche): por cada 1,5 ml de tampón A: 0,2 μ l de una solución de 1 tableta en 2 ml) y a pulverizarlas en un mortero de porcelana hasta dejarlas en forma de una harina (7). El homogeneizado fue tratado con ultrasonido en un baño de agua por espacio de 6 x 10 seg. y fue centrifugado por espacio de 40 min.
60 a 100.000 g y a 4°C, y se recuperó el supernatante obtenido. El pellet de células que quedó fue pulverizado bajo nitrógeno, tratado con ultrasonido y centrifugado otra vez como se ha descrito anteriormente. El segundo supernatante resultante de ello fue reunido con el primer supernatante y almacenado a -80°C hasta el posterior procesamiento.

65 2. *Análisis proteómico comparativo usando extractos hepáticos de babuinos*

Se usaron para un análisis proteómico extractos de proteínas hepáticas de por un lado babuinos sanos (control) y por otro lado babuinos a los cuales les había sido inyectado LPS. Para la electroforesis analítica en gel bidimensional

ES 2 327 063 T3

extracto hepático que contenía 150 µg de proteína fue ajustado a urea 9M, DTT 70 mM, 2% de anfolito pH 2-4, y fue luego sometido a separación mediante electroforesis analítica en gel bidimensional (8). La visualización de las proteínas en el gel de electroforesis bidimensional se hizo mediante coloración con plata (9).

5 Para la evaluación los patrones de manchas de proteínas de las muestras de animales no tratados fueron comparados con los patrones de manchas de proteínas que resultaron de las muestras de tejido hepático de animales tratados. La Fig. 1 muestra una comparación de los geles de electroforesis bidimensionales para una muestra de control (A) y una muestra de un animal tratado con LPS (B). La mancha de proteína adicional en (B) con un peso molecular aparente de aproximadamente 29000 daltons y un punto isoelectrico aparente de aproximadamente 8,0 a 8,2 fue analizada por
10 espectrometría de masas, después de haber sido la proteína que surge diferencialmente y es identificada en el patrón de manchas de proteína de la electroforesis analítica en gel bidimensional preparada adicionalmente a continuación mediante electroforesis preparativa en gel bidimensional usando 350 µg de proteína.

15 En la electroforesis preparativa en gel bidimensional la coloración se hizo mediante Azul Brillante de Coomassie G250 (10).

La mancha de proteína preseleccionada para el ulterior análisis fue separada del gel por corte y fue digerida con tripsina usando un método publicado (11), y los fragmentos de tripsina generados fueron a continuación analizados mediante espectrometría de masas por electronebulización (ESI-MS) (12-14). Se usó un espectrómetro de masas Q-TOF con una fuente de iones de Z-spray de nanoflujo de la firma Micromass, del R.U. Se trabajó según las instrucciones de trabajo del fabricante del aparato.

3. Identificación de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4)

25 Del espectro matriz de la proteína digerida con tripsina de la mancha seleccionada fueron respectivamente identificados mediante ESI-MS/MS los distintos péptidos individuales ("marcadores"). Los espectros de masas obtenidos para estos fragmentos podían ser evaluados analíticamente de manera en sí conocida. La búsqueda en banco de datos con los marcadores de secuencia de ESI-MS/MS fue efectuada con ayuda de MS-Edman (<http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/ucshtml3.2/msedman.htm>), que está localizado en el servidor Protein Prospector del Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de San Francisco, California.

30 La Fig. 2A muestra a título de ejemplo el resultado de MS/MS para el péptido con la masa de 669,76 y la secuencia A(K/Q)DGAHVV que se lee a partir del espectro (K y Q no pueden ser diferenciados por espectrometría de masas). La Fig. 2B muestra otro péptido con la masa de 814,44 y el espectro que resulta del mismo y la secuencia de aminoácidos de TASTDG(I/L)GS (I y L no pueden ser diferenciados mediante espectrometría de masas).

40 Ambas secuencias de aminoácidos fueron comparadas con todas las secuencias de las proteínas de mamífero del banco de datos NCBI N° 18.09.00 y NCBI N° 6.17.2000. La mejor coincidencia para ambos péptidos (A(K/Q)DGAHVV y TASTDG(I/L)GS) fue hallada con partes de la proteína humana DHRS4 (alcohol deshidrogenasa peroxisomal de cadena corta): AQDGAHVV y TASTDGIGF. Esta identificación debe considerarse como fuera de toda duda. Para la DHRS4 humana (ID SEC N°:1) se calcula un peso molecular de 29,5 kDa y un punto isoelectrico de 8,8. Estos valores son muy cercanos a los valores observados experimentalmente (véase lo indicado anteriormente) y apoyan el resultado de la identificación.

45 Sobre la base de la alta similitud de las reacciones patofisiológicas de los babuinos y los humanos, que se ha puesto repetidamente de manifiesto también precisamente en las numerosas investigaciones de la solicitante sobre las que se ha tratado anteriormente y que se basan en los resultados de una sepsis inducida artificialmente en babuinos, puede partirse de la base de que en pacientes humanos infectados o sépticos se dan en esencia circunstancias idénticas a las que corresponden al modelo animal de los babuinos que se ha descrito. Esta suposición básica se confirmó mediante determinación inmunodiagnóstica de DHRS4 en plasmas humanos de sujetos sanos y pacientes con sepsis.

50 Con esta finalidad fueron desarrollados inmunoensayos en sándwich para DHRS4 y con ello se investigó la aparición de DHRS4 en la circulación sanguínea de distintos grupos de pacientes.

55

4. Producción de componentes de ensayo para inmunoensayos de determinación de DHRS4

4.1. Síntesis de péptidos

60 Para la producción de anticuerpos contra DHRS4 fueron sintetizados a partir de la secuencia de aminoácidos de DHRS4 péptidos parciales con los cuales se inmunizaron ovejas (Fig. 3). Para la selección de los péptidos se tomaron en consideración informaciones sobre la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, con el objetivo de producir anticuerpos que sean adecuados para fijar DHRS4 nativa.

65 Sacadas de la secuencia de aminoácidos conocida de DHRS4 fueron seleccionadas cuatro zonas (Pos. 19-30, 209-228, 230-247, 256-278). Las zonas fueron (Pos. 19-30 y 230-247 respectivamente completadas con un residuo de cisteína N-terminal) sintetizadas químicamente como péptidos solubles según procedimientos estándar, purificadas,

ES 2 327 063 T3

sometidas a control de calidad mediante espectrometría de masas y HPLC de fase inversa y liofilizadas en partes alícuotas (firma JERINI AG, de Berlín, Alemania). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos son las siguientes:

| | | |
|----|-------|---------------------------------------|
| 5 | PML13 | CMASSGMTRRDPL (ID SEC N°:2) |
| | PLE20 | CLAPGLIKTSFSRMLWMDKE (ID SEC N°:3) |
| | PED19 | CEESMKETLRIRRLGEPED (ID SEC N°:4) |
| 10 | PSL23 | CSEDASYITGETVVVGGGTPSRL (ID SEC N°:5) |

4.2. Conjugación e inmunización

15 Mediante MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) los péptidos PML13, PLE20, PED19 y PSL23 fueron conjugados con la proteína portadora KLH (Keyhole limpet hemocyanin) (véanse las instrucciones de trabajo “NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers” de la firma PIERCE, de Rockford, IL, EE.UU.). Con estos conju-
20 gados fueron inmunizadas ovejas según el esquema siguiente: Cada oveja recibió inicialmente 100 µg de conjugado (estando el dato de masa referido a la parte peptídica del conjugado) y a continuación cada 4 semanas respectivamente 50 µg de conjugado (estando el dato de masa de referido a la parte peptídica del conjugado). Empezando en el cuarto mes tras el comienzo de la inmunización fueron extraídos cada 4 semanas por cada oveja 700 ml de sangre, y mediante centrifugación se obtuvo antisuero de los mismos. Las conjugaciones, las inmunizaciones y la obtención de antisue-
25 ros fueron realizadas por la firma MicroPharm, de Carmarthenshire, R.U.

4.3. Purificación de los anticuerpos

En un procedimiento de 1 paso se prepararon los anticuerpos péptido-específicos a partir de los antisue-
30 ros que habían sido obtenidos comenzando con el cuarto mes después de la inmunización.

Para ello, los péptidos PML13, PLE20, PED19 y PSL23 fueron primeramente acoplados a gel SulfoLink (véanse las instrucciones de trabajo “Sulfolink Kit” de la firma PIERCE, de Rockford, IL, EE.UU.). Para el acoplamiento se
35 aportaron respectivamente 5 mg de péptido por cada 5 ml de gel.

La purificación por afinidad de anticuerpos péptido-específicos de antisue-
40 ros de oveja contra los péptidos se hizo de la manera siguiente:

Las columnas de péptidos fueron en primer lugar lavadas tres veces alternativamente con 10 ml de tampón de
45 elución (ácido cítrico 50 mM, pH 2,2) y tampón de fijación (fosfato sódico 100 mM, 0,1% de Tween, pH 6,8), res-
pectivamente. 100 ml de los antisue-
ros fueron filtrados a través de un tamaño de poro de 0,2 µm y mezclados con el material de columna existente. Para ello, el gel fue barrido de la columna cuantitativamente con 10 ml de tampón
50 de fijación. La incubación se hizo durante la noche a temperatura ambiente y bajo agitación. Las cargas se pasaron cuantitativamente a columnas vacías (NAP 25, Pharmacia). Fueron desechados los materiales que pasaron a través de las columnas. A continuación se efectuó lavado con 250 ml de tampón de fijación exento de proteína (contenido de proteína del eluido de lavado < 0,02 A 280 nm). Se aportó a las columnas lavadas tampón de elución, y se reunieron
55 fracciones a razón de 1 ml. De cada fracción se determinó el contenido de proteína mediante el método BCA (véanse las instrucciones de trabajo de la firma PIERCE, de Rockford, IL, EE.UU.). Fueron combinadas las fracciones con concentraciones de proteína > 0,8 mg/ml. Tras la determinación de proteínas del combinado mediante el método BCA se obtuvieron unas producciones de 57 mg para el anticuerpo anti-
60 anti-
PLE13, 56 mg para el anticuerpo anti-
PLE20, 12 mg para el anticuerpo anti-
PED19 y 99 mg para el anticuerpo anti-
PSL23.

4.4. Marcación de los anticuerpos

Mediante columnas de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) se cambiaron de tampón según las instrucciones de
65 trabajo respectivamente 500 µl de los anticuerpos anti-
PLE20, anti-
PED19 y anti-
PSL23 purificados (véase lo expuesto anteriormente) en 1 ml de tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8,0), respectivamente. Las concentraciones de proteína de las soluciones de anticuerpos fueron ajustadas a 1,5 mg/ml con tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8,0).

Para la marcación por quimioluminiscencia todos los anticuerpos fueron tratados adicionalmente de la manera
70 siguiente: 67 µl de la solución de anticuerpos fueron mezclados con 10 µl de MA70-acridinio-NHS-éster (1 mg/ml; firma HOECHST Behring) y se tuvieron en incubación por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron añadidos 423 µl de glicina 1M y se efectuó incubación por espacio de otros 10 minutos. A continuación, por medio de una columna de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) se cambió de tampón según las instrucciones de trabajo la preparación de marcación en 1 ml de eluyente A (fosfato potásico 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) y se le retiraron los
75 componentes de bajo peso molecular. Para la separación de los últimos residuos de etiquetas no fijadas a anticuerpos se hizo una HPLC de filtración en gel (columna: Waters Protein Pak SW300). La muestra fue cargada y cromatografiada con un caudal de 1 ml/min. con eluyente A. Con un fotómetro de flujo fueron medidas las longitudes de onda de 280 nm y 368 nm. La relación de absorción a 368 nm/280 nm como medida del grado de marcación del anticuerpo fue

en el pico de 0,10 +/- 0,01. Las fracciones con contenido de anticuerpos monómeros (tiempo de retención 8-10 min.) fueron reunidas y puestas en 3 ml de fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, 5% de albúmina sérica bovina, 0,1% de azida sódica, pH 7,4.

5 4.5. Inmovilización de los anticuerpos

Tubitos de poliestireno de 5 ml irradiados (firma Greiner) fueron recubiertos como se indica a continuación con anticuerpos anti-PML13 y anticuerpos anti-PLE20 purificados, respectivamente. El anticuerpo fue diluido en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 hasta una concentración de 6,6 µg/ml. Se pipetaron al interior de cada tubito 300 µl de esta solución. Los tubitos fueron incubados por espacio de 20 horas a 22°C. Se aspiró la solución. Entonces se llenó cada tubito con 4,2 ml de fosfato sódico 10 mM, 2% de Karion FP, 0,3% de albúmina sérica bovina, pH 6,5. Tras haber transcurrido 20 horas fue aspirada la solución. Finalmente los tubitos fueron secados en un secador al vacío.

15 5. Realización y valoración de los inmunoensayos de determinación de DHRS4

5.1. Determinación de DHRS4 en plasmas humanos

Fue desarrollado un primeramente inmunoensayo en sándwich para DHRS4 (anticuerpos contra las zonas Pos. 209-228 o el péptido PLE20 y 256-278 o el péptido PSL23) con una sensibilidad funcional de ensayo de aproximadamente 2 U/l (típica curva estándar: véase la Fig. 4).

Con este ensayo fueron medidas muestras de plasma de sujetos sanos y pacientes de sepsis (Fig. 5). Todas las muestras de sujetos sanos arrojaron valores de medición inferiores a la sensibilidad funcional de ensayo; y 38 de las 50 muestras de pacientes de sepsis arrojaron valores de medición superiores a la sensibilidad funcional de ensayo. Se da una sensibilidad diagnóstica de un 76% para una especificidad del 100%.

5.2. Determinación inmunodiagnóstica de DHRS4 en sueros humanos - comparación metodológica

En una comparación metodológica se demostró que los ensayos en sándwich que usan anticuerpos contra otros epítopes de la DHRS4 conducen a la obtención de resultados equiparables a los del ensayo utilizado en 5.1 (Fig. 6).

Para ello se establecieron en total tres inmunoensayos en sándwich para DHRS4 que trabajaban con los anticuerpos siguientes:

- 35 a) Fase fija: anti-PLE20, indicador: anti-PSL23 (véase 5.1.)
- b) Fase fija: anti-PLE20, indicador: anti-PED19
- 40 c) Fase fija: anti-PML13, indicador: anti-PLE20

Sirvió en cada caso de material estándar DHRS4 humana recombinante en forma de un extracto de bacterias *E. coli* transformadas (*In Vivo* GmbH, de Hennigsdorf, Alemania). La clonación y expresión del gen de DHRS4 se efectuaron según procedimientos biologicomoleculares estándar. El extracto fue diluido serialmente en suero de caballo normal (firma SIGMA). A los patrones así producidos les fueron atribuidas concentraciones en unidades arbitrarias.

Las muestras de medición eran plasmas EDTA de sujetos aparentemente sanos y de pacientes con sepsis.

Los tres inmunoensayos en sándwich fueron preparados de la misma manera como se indica a continuación: Se pipetaron al interior de los respectivos tubitos de ensayo recubiertos con anticuerpos 100 µl de patrones y de muestras así como 100 µl de tampón de ensayo (fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, 5% de albúmina sérica bovina, 0,1% de IgG inespecífica de oveja, 0,1% de azida sódica, pH 7,4) que contenía 1 millón de RLU (unidades relativas de luz) del respectivo anticuerpo marcado con MA70. Se hizo incubación por espacio de 20 horas a 22°C con sacudimiento. Luego se hicieron 4 lavados con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) por tubito cada vez, se dejó que se escurriesen los tubitos y se midió la quimioluminiscencia fijada al tubito en un luminómetro (firma BERTHOLD, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG).

Usando el software MultiCalc (Spline Fit) fueron leídas las concentraciones de DHRS4 de las muestras en la curva estándar.

60 5.3. Estimación de las posibles influencias perturbadoras para la determinación inmunodiagnóstica de DHRS4

Para evaluar si los anticuerpos que fueron producidos contra los péptidos seleccionados podrían también reaccionar en el marco de una reacción cruzada con otros péptidos/proteínas humanos distintos de la DHRS4 (SCAD-SLR), se comparó la DHRS4 mediante "Quickblast" con todas las secuencias humanas que están contenidas en el banco de datos SWISSPROT. Fueron analizadas más detalladamente las secuencias halladas que presentaban similitud con la DHRS4 y contenían zonas que correspondían a epítopes para tales anticuerpos que se usaron en las tres variantes de ensayo en sándwich realizadas. Se hallaron dos variantes de corte y empalme de DHRS4, así como el producto del

gen de DHRS2 (Fig. 7A, 7B). Sería de esperar una reactividad cruzada con ambas variantes de corte y empalme, en tanto que el anticuerpo anti-PLE20 reconociese también solamente la secuencia LWMDKE (lo cual no fue investigado experimentalmente). Una reactividad cruzada con el producto del gen de DHRS2 parece sin embargo más bien improbable debido a la escasa homología secuencial, pero no puede ser excluida por completo.

Puesto que no es sabido si y en qué concentraciones la DHRS4 está también presente en las células sanguíneas, pero esto es relevante para la toma de muestras (hemólisis, separación incompleta de trombocitos), fue totalmente hemolizada mediante ultrasonido y luego medida con respecto a la DHRS4 sangre con EDTA de sujetos de ensayo normales. Fueron con ello detectadas concentraciones de 1-3 U/l (datos no indicados). Esto indica que la DHRS4 está presente en las células sanguíneas, pero lo está en concentraciones tan pequeñas, que la hemólisis parcial o la separación incompleta parcial de trombocitos no ejercen influencia relevante alguna en los resultados de medición.

Está por ver mediante qué mecanismo la DHRS4 pasa a la circulación de la sangre en la sepsis.

1. **Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D.** 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34:6003-6013.

2. **Clark, H.F., Gurney, A.L., Abaya, E., Baker, K., Baldwin, D., Brush, J., Chen, J., Chow, B., Chui, C., Crowley, C., et al.** 2003. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res* 13:2265-2270.

3. **Fransen, M., Van Veldhoven, P.P., and Subramani, S.** 1999. Identification of peroxisomal proteins by using M13 phage protein VI phage display: molecular evidence that mammalian peroxisomes contain a 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Biochem J* 340 (Pt 2):561-568.

4. **Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., and Subramani, S.** 1989. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108:1657-1664.

5. **Redl, H., Schlag, G., Togel, E., Assicot, M., and Bohuon, C.** 2000. Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: relationship to cytokines and neopterin. *Crit Care Med* 28:3659-3663.

6. **Redl, H., and Schlag, G.** 1998. Non-human primate models of sepsis. *Sepsis* 2:243-253.

7. **Klose, J.** 1999. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 112:67-85.

8. **Klose, J., and Kobalz, U.** 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16:1034-1059.

9. **Heukeshoven, J., and Dernick, R.** 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32.

10. **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262.

11. **Otto, A., Thiede, B., Muller, E.C., Scheler, C., Wittmann-Liebold, B., and Jungblut, P.** 1996. Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry. *Electrophoresis* 17:1643-1650.

12. **Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A., and Mann, M.** 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20:46-50.

13. **Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R.** 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276:561-567.

14. **Mann, M., and Pandey, A.** 2001. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. *Trends Biochem Sci* 26:54-61.

15. **Kallberg, Y., Oppermann U., Jörnvall H. and Persson, B.,** *Eur. J. Biochem.* 269, 4409-4417 (2002).

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias que cita el solicitante se aporta solamente en calidad de información para el lector y no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha procedido con gran esmero al compilar las referencias, no puede excluirse la posibilidad de que se hayan producido errores u omisiones, y la OEP se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • DE 4227454 C1 [0008] • WO 03048780 A [0017]
- DE 4227454 C2 [0010] • WO 03048781 A [0017]
- 15 • EP 0656121 B1 [0010] • WO 03089933 A [0017]
- US 5639617 A [0010] • WO 0153486 A [0029] [0031]
- DE 19847690 A1 [0014] • WO 2004003162 A2 [0033]
- 20 • WO 0022439 A [0014] • US 20020160392 A1 [0034]
- WO 02085937 A [0017] • US 4822733 A [0039]
- WO 03005035 A [0017] • EP 180492 B1 [0039]
- 25 • WO 03002600 A [0017] • EP 539477 B1 [0039]
- WO 03089934 A [0017] • DE 102005011421 [0076]

Literatura no de patentes que se cita en la descripción

- 30 • A. **BEISHUIZEN** *et al.* Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock. *Advances in Clinical Chemistry*, 1999, vol. 33, 55-131 [0006]
- 35 • C. **GABAY** *et al.* Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 1999, vol. 340 (6), 448-454 [0006]
- Sepsis und septischer Schock. K. **REINHART** *et al.* Intensivmedizin. *Georg Thieme Verlag*, 2001, 756-760 [0006]
- 40 • MITCHELL M. **LEVY** *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference. *Crit Care Med*, 2003, vol. 31 (4), 1250-1256 [0006]
- NIELS C. **RIEDEMANN** *et al.* The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.*, 2003, vol. 112, 460-467 [0006]
- 45 • G. **PILZ** *et al.* Acute Physiology and Chronic Health Evaluation. *Krankenpflege-Journal*, 1991, vol. 29, 483-492 [0008]
- JOHN C. **MARSHALL** *et al.* *Crit Care Med*, 2003, vol. 31 (5), 1560-1567 [0009]
- 50 • M. **ASSICOT** *et al.* High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *The Lancet*, 1993, vol. 341 (8844), 515-518 [0010]
- VON SHAWN D. **CARRIGAN** *et al.* Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. *Clinical Chemistry*, August 2004, vol. 50 (8), 1301-14 [0011]
- 55 • J. **STRUCK** *et al.* *Immuno-analyse & biologie spécialisée*, 2004, vol. 19, 131-137 [0017]
- **JORNVALL**, H.; **PERSSON**, B.; **KROOK**, M.; **ATRIAN**, S.; **GONZALEZ-DUARTE**, R.; **JEFFERY**, J.; **GHOSH**, D. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 1995, vol. 34, 6003-6013 [0075]
- **HEUKESHOVEN**, J.; **DERNICK**, R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 1988, vol. 9, 28-32 [0075]
- 65 • **NEUHOFF**, V.; **AROLD**, N.; **TAUBE**, D.; **EHRHARDT**, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988, vol. 9, 255-262 [0075]

ES 2 327 063 T3

- OTTO, A.; THIEDE, B.; MULLER, E.C.; SCHELER, C.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; JUNGBLUT, P. Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1996, vol. 17, 1643-1650 [0075]
- 5 • CLARK, H.F.; GURNEY, A. L.; ABAYA, E.; BAKER, K.; BALDWIN, D.; BRUSH, J.; CHEN, J.; CHOW, B.; CHUI, C.; CROWLEY, C. *et al.* The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res*, 2003, vol. 13, 2265-2270 [0075]
- 10 • FRANSEN, M.; VAN VELDHoven, P.P.; SUBRAMANI, S. Identification of peroxisomal proteins by using M13 phage protein VI phage display: molecular evidence that mammalian peroxisomes contain a 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Biochem J*, 1999, vol. 340 (2), 561-568 [0075]
- 15 • GOULD, S.J.; KELLER, G.A.; HOSKEN, N.; WILKINSON, J.; SUBRAMANI, S.A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol*, 1989, vol. 108, 1657-1664 [0075]
- REDL, H.; SCHLAG, G.; TOGEL, E.; ASSICOT, M.; BOHUON, C. Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: relationship to cytokines and neopterin. *Crit Care Med*, 2000, vol. 28, 3659-3663 [0075]
- 20 • REDL, H.; SCHLAG, G. Non-human primate models of sepsis. *Sepsis*, 1998, vol. 2, 243-253 [0075]
- KLOSE, J. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 1999, vol. 112, 67-85 [0075]
- 25 • KLOSE, J.; KOBALZ, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1995, vol. 16, 1034-1059 [0075]
- 30 • NEUBAUER, G.; KING, A.; RAPPSILBER, J.; CALVIO, C.; WATSON, M.; AJUH, P.; SLEEMAN, J.; LAMOND, A.; MANN, M. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet*, 1998, vol. 20, 46-50 [0075]
- LINGNER, J.; HUGHES, T.R.; SHEVCHENKO, A; MANN, M.; LUNDBLAD, V.; CECH, T.R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 1997, vol. 276, 561-567 [0075]
- 35 • MANN, M.; PANDEY, A. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. *Trends Biochem Sci*, 2001, vol. 26, 54-61 [0075]
- 40 • KALLBERG, Y.; OPPERMAN U.; JÖRNVALL H.; PERSSON, B. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, 4409-4417 [0075]

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4) con la secuencia de aminoácidos según la ID SEC N°:1 como biomarcador humoral para la detección diagnóstica y para la prognosis evolutiva así como para el control evolutivo y terapéutico de inflamaciones e infecciones.

10 2. Uso según la reivindicación 1 dentro del marco de la identificación anticipada y la identificación diagnóstico-diferencial, para la determinación del grado de gravedad y para el control evolutivo y terapéutico de sepsis e infecciones graves mediante determinación *ex vivo* de la aparición y/o de la cantidad de DHRS4 con la secuencia de aminoácidos según la ID SEC N°:1 y/o de fragmentos, variantes de corte y empalme y formas postraslacionales modificadas de DHRS4 de aparición patofisiológica con inmunorreactividad de DHRS4 en un fluido biológico, y en particular en el suero o el plasma de un paciente.

15 3. Procedimiento *ex vivo* para la identificación anticipada y la identificación diagnóstico-diferencial, para la prognosis evolutiva y para el enjuiciamiento del grado de gravedad y para el control evolutivo y terapéutico de sepsis e infecciones graves, y en particular de infecciones sistémicas similares a la sepsis, **caracterizado** por el hecho de que en un fluido biológico de un paciente y con ayuda de un ensayo de fijación de ligandos se determina la presencia y/o la cantidad de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4) con la secuencia de aminoácidos la ID SEC N°:1 y/o de fragmentos, variantes de corte y empalme y formas postraslacionales modificadas de DHRS4 de aparición patofisiológica con inmunorreactividad de DHRS4, y de la determinación y/o de la cantidad de inmunorreactividad de DHRS4 se sacan conclusiones con respecto a la presencia, a la evolución previsible, al grado de gravedad o al éxito de una terapia de una sepsis o infección.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que el ensayo de fijación de ligandos es un inmunoensayo heterogéneo u homogéneo en forma de un ensayo en sándwich.

30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizado** por el hecho de que es ejecutado dentro del marco de una determinación multiparamétrica en la que al mismo tiempo se determina al menos un adicional parámetro de sepsis y se obtiene un resultado de medición en forma de un conjunto de al menos dos magnitudes de medición que es valorado para la diagnosis fina de la sepsis y para la estratificación de pacientes.

35 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** por el hecho de que dentro del marco de la determinación multiparamétrica además de la inmunorreactividad de DHRS4 se determina al menos un parámetro adicional que es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de procalcitonina, CA 19-9, CA 125, S100B, proteínas S100A, fragmentos de citoqueratinas solubles, y en particular CYFRA 21, TPS y/o fragmentos de citoqueratina-1 solubles (sCY1F), las enzimas aldosa-1-epimerasa, glicina-N-aciltransferasa (GNAT), Cu/Zn-SOD, carbamoilfosfato sintetasa (CPS) y fragmentos de las enzimas mencionadas, los péptidos inflamina, CHP, LASP-1, gastroquina 1 así como inmunorreactividad derivada, precursores de péptidos vasoactivos, y en particular de pro-ANP, pro-endotelina, pro-vasopresina y pro-adrenomedulina así como citoquinas, interleuquinas, TNF y la proteína C-reactiva (CRP).

45 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, **caracterizado** por el hecho de que la determinación multiparamétrica se efectúa como determinación simultánea mediante un dispositivo de medición de la tecnología de chips o un dispositivo de medición inmunocromatográfica.

50 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** por el hecho de que la valoración del complejo resultado de medición obtenido con el dispositivo de medición se efectúa con ayuda de un programa de ordenador.

55 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 4, **caracterizado** por el hecho de que está configurado como ensayo rápido o ensayo de POC (Point-of-Care).

60 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que es un procedimiento inmunocromatográfico con una marcación directa detectable visualmente.

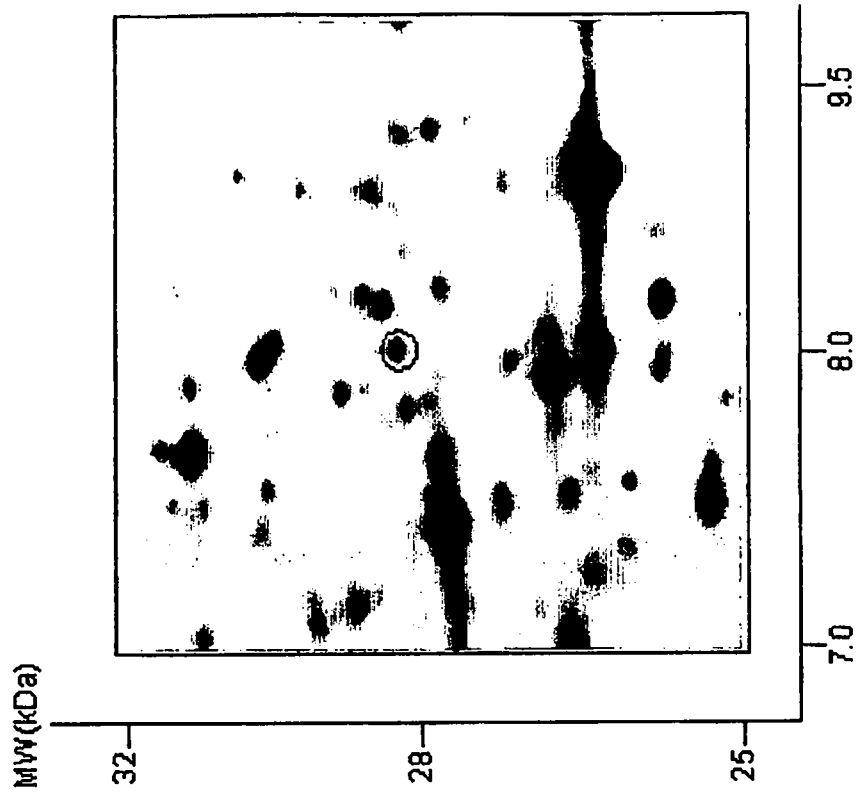


FIGURA 1A

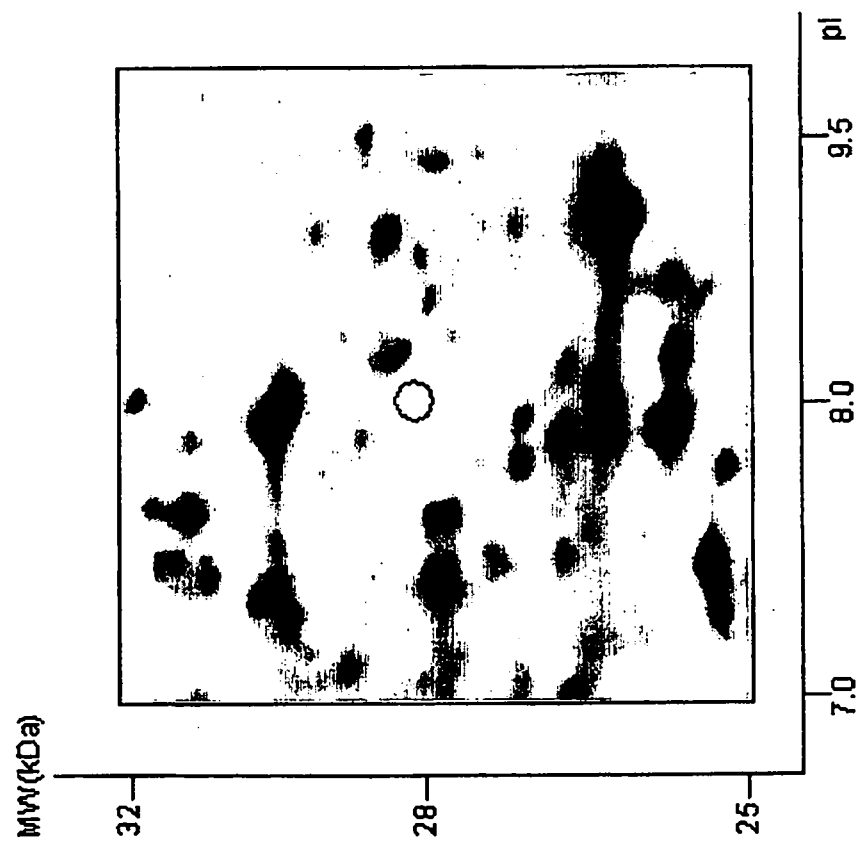


FIGURA 1B

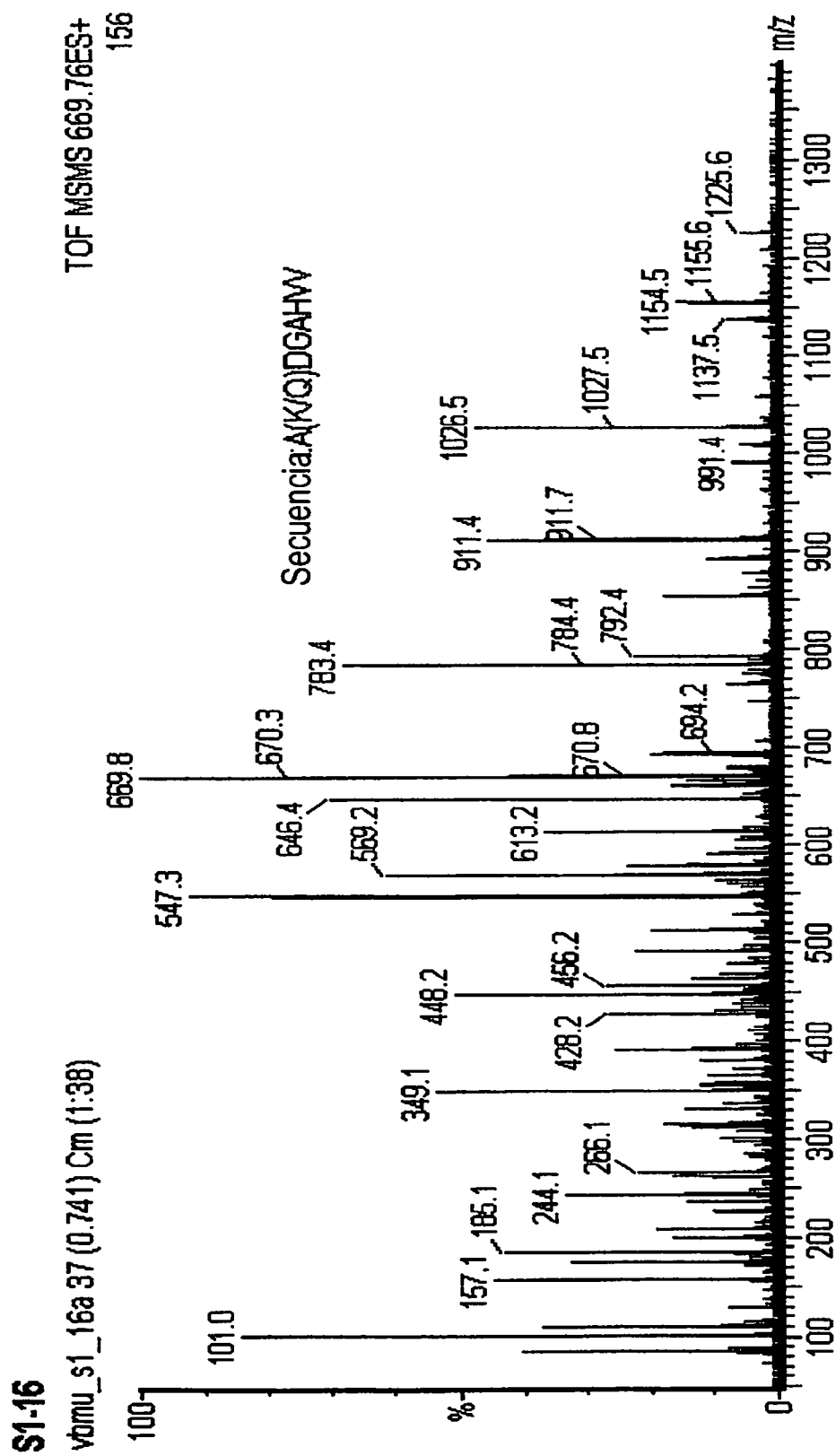


FIGURA 2A

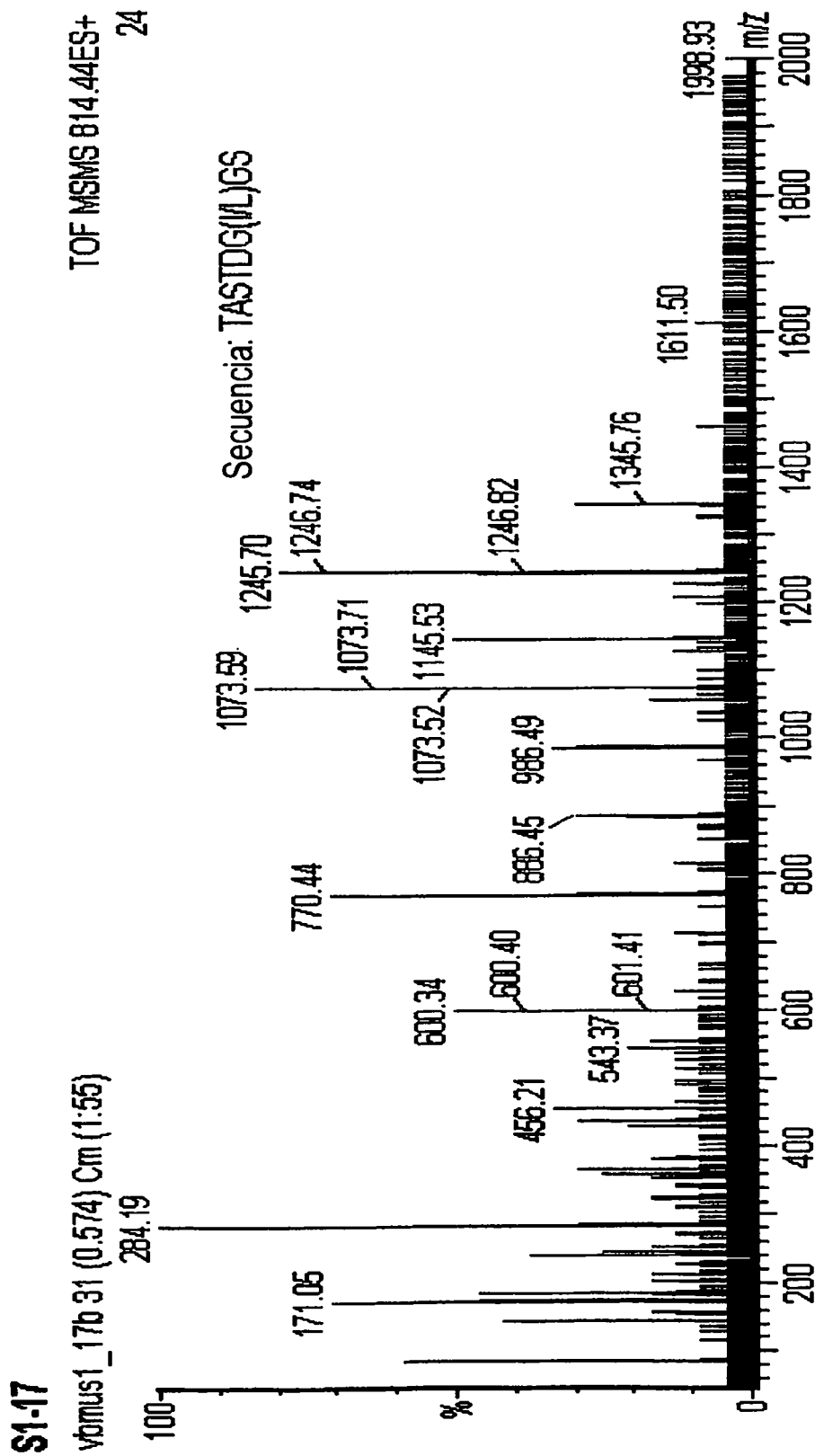


FIGURA 2B

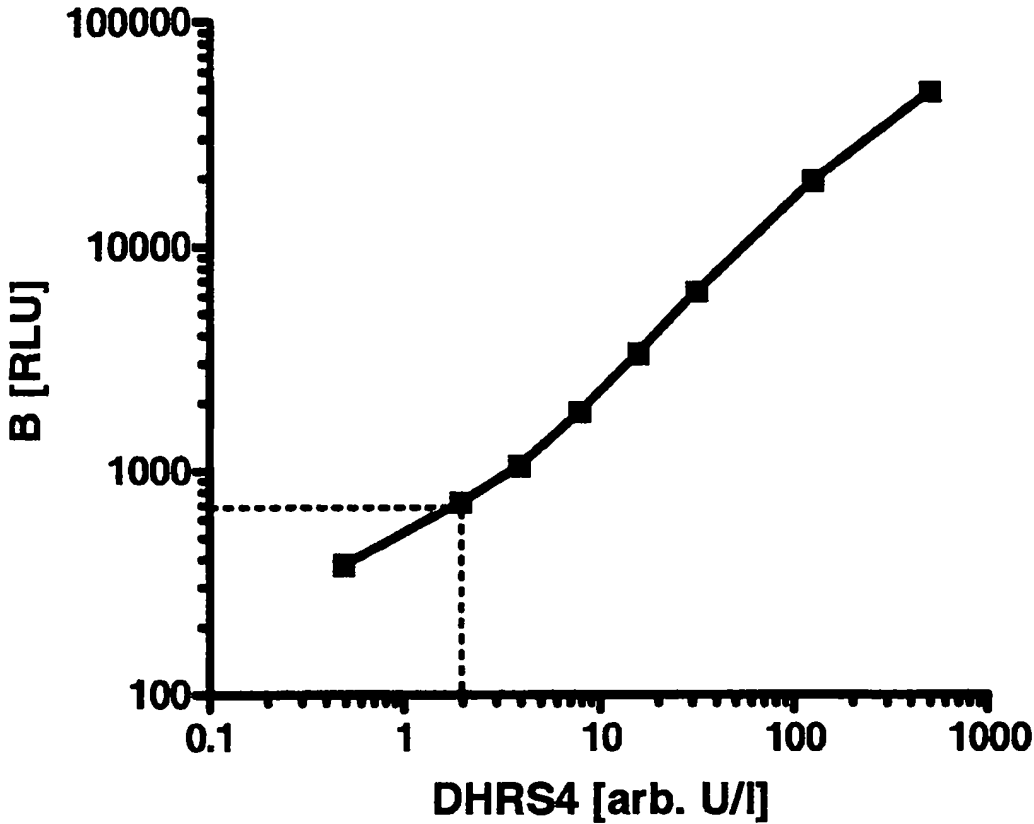


FIGURA 4

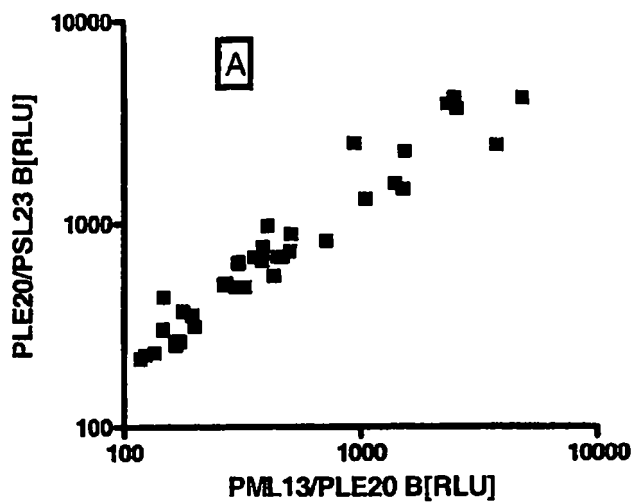


FIGURA 6A

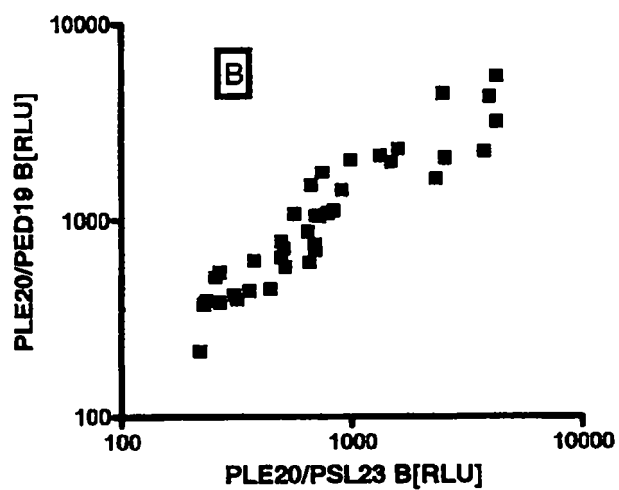


FIGURA 6B

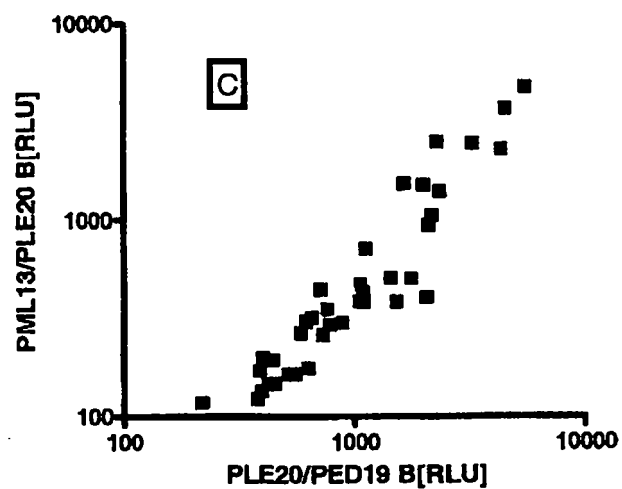


FIGURA 6C

ES 2 327 063 T3

LISTA DE SECUENCIAS

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

5 <120> Determinación de SRL-alcohol deshidrogenasa de cadena corta (DHRS4) como biomarcador para inflamaciones e infecciones

<130> 4514 PCT

10 <150> DE 102005011421.0
<151> 2005-03-11

15 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1
<211> 278
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

30 **Met His Lys Ala Gly Leu Leu Gly Leu Cys Ala Arg Ala Trp Asn Ser**
 1 5 10 15

Val Arg Met Ala Ser Ser Gly Met Thr Arg Arg Asp Pro Leu Ala Asn
 20 25 30

35 **Lys Val Ala Leu Val Thr Ala Ser Thr Asp Gly Ile Gly Phe Ala Ile**
 35 40 45

40 **Ala Arg Arg Leu Ala Gln Asp Gly Ala His Val Val Val Ser Ser Arg**
 50 55 60

45 **Lys Gln Gln Asn Val Asp Gln Ala Val Ala Thr Leu Gln Gly Glu Gly**
 65 70 75 80

50 **Leu Ser Val Thr Gly Thr Val Cys His Val Gly Lys Ala Glu Asp Arg**
 85 90 95

55 **Glu Arg Leu Val Ala Thr Ala Val Lys Leu His Gly Gly Ile Asp Ile**
 100 105 110

60 **Leu Val Ser Asn Ala Ala Val Asn Pro Phe Phe Gly Ser Ile Met Asp**
 115 120 125

65 **Val Thr Glu Glu Val Trp Asp Lys Thr Leu Asp Ile Asn Val Lys Ala**
 130 135 140

Pro Ala Leu Met Thr Lys Ala Val Val Pro Glu Met Glu Lys Arg Gly
 145 150 155 160

ES 2 327 063 T3

Gly Gly Ser Val Val Ile Val Ser Ser Ile Ala Ala Phe Ser Pro Ser
 165 170 175
 5
 Pro Gly Phe Ser Pro Tyr Asn Val Ser Lys Thr Ala Leu Leu Gly Leu
 180 185 190
 10
 Thr Lys Thr Leu Ala Ile Glu Leu Ala Pro Arg Asn Ile Arg Val Asn
 195 200 205
 15
 Cys Leu Ala Pro Gly Leu Ile Lys Thr Ser Phe Ser Arg Met Leu Trp
 210 215 220
 20
 Met Asp Lys Glu Lys Glu Glu Ser Met Lys Glu Thr Leu Arg Ile Arg
 225 230 235 240
 Arg Leu Gly Glu Pro Glu Asp Cys Ala Gly Ile Val Ser Phe Leu Cys
 245 250 255
 25
 Ser Glu Asp Ala Ser Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Val Val Val Gly Gly
 260 265 270
 30
 Gly Thr Pro Ser Arg Leu
 275

<210> 2

35 <211> 13

<212> PRT

<213> Sintética

40 <400> 2

Cys Met Ala Ser Ser Gly Met Thr Arg Arg Asp Pro Leu
 1 5 10

45

<210> 3

<211> 20

50 <212> PRT

<213> Sintética

<400> 3

55

Cys Leu Ala Pro Gly Leu Ile Lys Thr Ser Phe Ser Arg Met Leu Trp
 1 5 10 15

60

Met Asp Lys Glu
 20

65 <210> 4

<211> 19

<212> PRT

ES 2 327 063 T3

<213> Sintética

<400> 4

5
Cys Glu Glu Ser Met Lys Glu Thr Leu Arg Ile Arg Arg Leu Gly Glu
1 5 10 15
10 Pro Glu Asp

<210> 5

15 <211> 23

<212> PRT

<213> Sintética

20 <400> 5

25 Cys Ser Glu Asp Ala Ser Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Val Val Val Gly
1 5 10 15
Gly Gly Thr Pro Ser Arg Leu
20

30

35

40

45

50

55

60

65