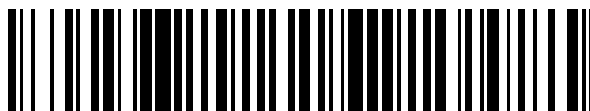


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 288**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2005 E 10011674 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2293079**

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

30 Prioridad:

13.05.2004 EP 04090191

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

25.11.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS y
SPARWASSER, ANDREA**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 431 288 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

5 **[0001]** La presente memoria descriptiva se refiere al uso de proencefalina y/o sus fragmentos, fragmentos que comprenden proencefalina y/o combinaciones de los mismos en diagnosis médica. En el siguiente texto, a todas estas moléculas, fragmentos, combinaciones de los mismos, etcétera, se les hace referencia como proencefalina, que comprende por ejemplo, también el péptido B y F, huella de encefalina (ENK-fp), proencefalina A y la secuencia de aminoácidos ID 1.

10 **[0002]** La proencefalina se puede usar para diagnosticar una variedad de enfermedades, que comprenden enfermedades/trastornos del sistema nervioso central, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, isquemia, comprendiendo isquemia del miocardio, esquizofrenia, enfermedades/trastornos del sistema inmunitario; enfermedades/condiciones de dolor, dolor crónico, migraña, cefalea de tipo tensional, enfermedades tumorales/cáncer comprendiendo leucemia linfoblástica, tumores cerebrales malignos, adenomas, en particular adenomas de pituitaria humana, trastornos de la barrera hematoencefálica, esclerosis múltiple, inflamación, artritis crónica, enfermedades infecciosas, infecciones bacterianas y virales, en particular infecciones de bacterias gram-positivas, infecciones por virus de la enfermedad de borna, peritonitis, intoxicación, SIDA, estrés, trauma, que comprende trauma en la cabeza, infarto, en particular infarto cerebral, enfermedades cardíacas y cardiovasculares, que comprenden cardiopatía coronaria, trastornos óseos y de la piel, malaria, enfermedad pulmonar obstructiva/crónica y daño cerebral.

25 **[0003]** El término proencefalina de la presente memoria descriptiva comprende también secuencias de aminoácidos que presentan una homología de por lo menos el 75%, preferentemente una homología de por lo menos el 80%, más preferentemente una homología de por lo menos el 90% con la proencefalina.

[0004] La memoria descriptiva se refiere además a anticuerpos desarrollados contra proencefalina y/o sus fragmentos y/o sus variantes de corte y empalme (*splice*), precursores y kits y ensayos que involucran dichos componentes.

30 Antecedentes de la invención

[0005] El gen de la proencefalina A humana (PENK-A) contiene 4 exones y codifica una serie de oligopéptidos estructuralmente relacionados tales como metionina-encefalina (Met-ENK), leucina-encefalina (Leu-ENK) y metionina-encefalina-arginina-fenilalanina (Met-ENK-Arg-Phe), así como metionina-encefalina-arginina-glicina-leucina (Met-ENK-Arg-Gly-Leu), en donde una molécula de proencefalina comprende las secuencias de 4 Met-ENK y una Leu-ENK, una Met-ENK-Arg-Phe y una Met-ENK-Arg-Gly-Leu cada una de ellas. La Met-ENK-Arg-Phe y la Met-ENK-Arg-Gly-Leu son adicionalmente metabolizadas a Met-ENK. Las encefalinas tienen una función como neurotransmisores, así como neuromoduladores y neurohormonas. La PENK-A además de las encefalinas comprende las secuencias de encelitina y péptido B en su terminal N, así como sinencefalina en su terminal C, que tienen una función antibacteriana.

40 **[0006]** La expresión de proencefalina se produce en el sistema nervioso central, así como en el sistema nervioso periférico. En el cerebro se observan concentraciones incrementadas de PENK en el núcleo caudado y en el núcleo accumbens, en la sustancia gris periacueductal así como en el hipocampo y los núcleos del rafe.

45 **[0007]** Las encefalinas desempeñan un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos tales como la percepción del dolor, la regulación de la respuesta al estrés, comprendiendo la regulación hormonal, la regulación de la formación de hueso, así como la regulación de respuestas inmunes. La Met-ENK estimula la proliferación de linfocitos B y T, y la Leu-ENK la proliferación de células T auxiliares y células T citotóxicas. Debido a las propiedades inmunorregulatorias de la Met-ENK, esta encefalina está clasificada como citoquina. Los péptidos de las encefalinas endógenas están también implicados en la regulación normal de funciones cardiovasculares tales como la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción y la presión sanguínea arterial.

50 **[0008]** La encelitina tiene función antibacteriana contra bacterias gram-positivas tales como las *Streptococcus aureus*, *Bacillus megaterium* y *Micrococcus luteus*, si bien no inhibe el crecimiento de bacterias gram-negativas tales como la *Escherichia coli*, así como el crecimiento de hongos. La sinencefalina presenta propiedades antibacterianas contra bacterias gram-positivas así como bacterias gram-negativas.

60 **[0009]** El nivel de encefalina se encuentra alterado en tejido y fluidos corporales en una variedad de enfermedades. La reactividad inmune de Met-ENK en plasma de pacientes que padecen de un infarto cerebral en fase aguda y de pacientes con diabetes con isquemia del miocardio sintomática está significativamente incrementada en comparación con individuos de control sanos, así como en plasma y fluido (*liquor*) de pacientes que padecen de migraña y cefalea y en fluido de pacientes con esquizofrenia.

[0010] En la enfermedad de Parkinson el contenido de Met-ENK-Arg-Gly-Leu en fluido de pacientes está significativamente reducido en comparación con individuos de control sanos.

[0011] Pacientes que padecían de la enfermedad de Alzheimer presentaban una reactividad inmune de tipo Met-ENK 4 veces mayor.

[0012] La concentración de RNAm de encefalina en el cuerpo estriado de pacientes que padecen de la enfermedad de Huntington está significativamente reducida, y en fluido se observaba una disminución de la concentración de Met-ENK-Arg-Gly-Leu.

[0013] En enfermedades tumorales los adenomas secretores de prolactina (PL) y de adrenocorticotropina (ACTH) de la hipófisis presentan una concentración incrementada de Met-ENK, así como una concentración de péptidos de proencefalina 10 veces mayor en ésta última.

[0014] Las encefalinas desempeñan un papel en la respuesta patofisiológica de tejido nervioso en lesiones traumáticas tales como lesiones de la cabeza y lesiones de la piel, por ejemplo durante cirugía y después de la misma.

[0015] Las encefalinas desempeñan además un papel importante en la patogénesis de inflamaciones sistémicas. En modelos animales la inducción de una peritonitis o la aplicación de lipopolisacáridos conducen a un incremento de la expresión de PENK, así como a un incremento de las concentraciones de Met-ENK en plasma.

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

[0016] La infección de ratas por borna-virus redundó en una transcripción incrementada de PENK-A en el cuerpo estriado.

[0017] La Met-ENK, la Met-ENK-Arg-Phe y los péptidos B y F de proencefalina están significativamente incrementados en plasma durante la hipotensión hemorrágica.

[0018] La biosíntesis de encefalinas (véase la Fig. 2) se produce, como en el caso de otras hormonas peptídicas, como preprohormona en ribosomas unidos (al Golgi). Tras la separación de la secuencia señal N-terminal hidrófoba por las denominadas peptidasas señal y el plegamiento de las proteínas en el lumen del retículo endoplasmático, los propéptidos son empaquetados en vesículas en el aparato de Golgi y son transportados a la membrana celular. Durante el transporte los propéptidos son procesados siendo así convertidos en hormonas maduras por las denominadas prohormona convertasas en secuencias de aminoácidos habitualmente dibásicos. Por medio de distintos estímulos los péptidos son secretados al espacio extracelular o al plasma. Los péptidos maduros son rápidamente inactivados tras la secreción por proteólisis.

[0019] Las encefalinas tienen una vida media de 12 a 15 minutos en plasma (*ex vivo*).

[0020] El procesado de la proencefalina se produce en varios pasos en un estricto orden en el tiempo y es histoespecífico. Un paso inicial en el procesado es la separación del péptido B C-terminal que comprende las secuencias de encelitina y Met-ENK-Arg-Phe. El procesado de la proencefalina conduce a la formación de distintos péptidos de proencefalina.

La presencia del fragmento 119-159 de PENK en fluido, aunque no en sangre, ya fue revelada por Stark et al., 2000.

[0021] En la medida en la que este fragmento desempeña un papel importante en esta invención, se le denomina en la presente "huella de encefalina" (ENK-fp).

[0022] Böttger et al. (1995), JMB, Vol. 247, págs. 932 a 946 dan a conocer un análisis de epítomos de proencefalina usando anticuerpos monoclonales. No se da a conocer ningún valor diagnóstico de la proencefalina.

Resumen de la invención

[0023] La invención en su forma más amplia está definida por las reivindicaciones independientes 1 y 5:

1. Método in vitro para la determinación de fragmentos de proencefalina en plasma con fines diagnósticos, en donde se determinan fragmentos de proencefalina que comprenden (i) los aminoácidos de ENK-fp que constan de aminoácidos 119 a 159 de la secuencia de aminoácidos completa de proencefalina según la ID SEC N°: 1 y (ii) aminoácidos adicionales de la secuencia de proencefalina ID SEC N°: 1 que comprende secuencias de aminoácidos ID SEC N°: 4 y/o ID SEC N°: 5, mediante un método inmunodiagnóstico que usa un primer anticuerpo que se une específicamente a dicho fragmento de proencefalina ENK-fp, uniéndose específicamente dicho primer anticuerpo al

péptido según la ID SEC N°: 3, en combinación con un segundo anticuerpo que se une a una de las secuencias de aminoácidos según la ID SEC N°: 4 ó la ID SEC N°: 5.

5. Kit para llevar a cabo un método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende dos anticuerpos que se unen a los fragmentos de proencefalina a determinar, en donde el primero de dichos anticuerpos se une específicamente al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 3, y el segundo de dichos anticuerpos se une específicamente a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 4 ó la ID SEC N°: 5.

[0024] En las reivindicaciones dependientes 2 a 4 se definen realizaciones preferidas.

[0025] En la presente memoria descriptiva se dan a conocer, únicamente a título de referencia, combinaciones de anticuerpos que no se circunscriben a las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

[0026] Las encefalinas se pueden detectar en diferentes fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales.

[0027] Sin embargo, la corta vida media de las encefalinas en sangre *ex vivo* ha obstaculizado hasta el momento el uso de encefalinas en diagnósticos rutinarios. Debido a la corta vida media de las encefalinas, no resulta posible en los diagnósticos rutinarios extraer muestras, obtener el plasma, transportar el plasma al laboratorio y efectuar el diagnóstico en el laboratorio incluyendo los ensayos requeridos antes de que las encefalinas alcancen un nivel de detección crítico.

[0028] De este modo, debido a la baja estabilidad *in vivo* de las encefalinas, el uso como biomarcador es extremadamente limitado incluso bajo una logística de muestras optimizada, en la medida en la que la influencia de la degradación de los péptidos diluye extremadamente la influencia de la biosíntesis y la liberación de encefalinas.

[0029] El objetivo de la invención consistía en superar la desventajosa vida media de las encefalinas y desarrollar un método y un kit para la determinación de encefalinas en fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales.

[0030] Este objetivo se ha logrado por el sorprendente descubrimiento de que la proencefalina se puede usar como herramienta para la determinación de encefalina en fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales. Esta presencia de las proencefalinas está correlacionada con la presencia de las encefalinas maduras tales como las Met-ENK en los distintos fluidos, tejidos o biomateriales corporales.

[0031] Además, la estabilidad de la proencefalina, de los fragmentos y/o combinaciones de los mismos *ex vivo* es sorprendentemente alta y hace que las proencefalinas resulten plenamente adecuadas a efectos de diagnóstico rutinario.

[0032] Se aplica lo mismo para la vida media *in vivo* de proencefalina, que es significativamente mayor que las de encefalina(s) madura(s), lo cual hace que resulten adecuadas para ser usadas en la detección de la concentración y de la velocidad de liberación de encefalina(s).

[0033] Este vínculo entre las proencefalinas de la presente invención y los péptidos maduros hace que las mismas sean adecuadas como herramientas de diagnosis para todas las enfermedades y/o trastornos en los que las proteínas maduras tales como las Met-ENK desempeñan un papel.

[0034] La proencefalina y los fragmentos según la presente invención se pueden usar por lo tanto para el diagnóstico de una variedad de enfermedades/trastornos, que comprenden enfermedades/trastornos del sistema nervioso central, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, isquemia, comprendiendo isquemia del miocardio, esquizofrenia, enfermedades/trastornos del sistema inmunitario, enfermedades/condiciones de dolor, dolor crónico, migraña, cefalea de tipo tensional, enfermedades tumorales/cáncer comprendiendo leucemia linfoblástica, tumores cerebrales malignos, adenomas, en particular adenomas de pituitaria humana, trastornos de la barrera hematoencefálica, esclerosis múltiple, inflamación, artritis crónica, enfermedades infecciosas, infecciones bacterianas y virales, en particular infecciones de bacterias gram-positivas, infecciones por virus de la enfermedad de borna, peritonitis, intoxicación, SIDA, estrés, trauma, que comprende trauma en la cabeza, infarto, en particular infarto cerebral, enfermedades cardíacas y cardiovasculares, que comprenden cardiopatía coronaria, trastornos óseos y de la piel, malaria, enfermedad pulmonar obstructiva/crónica y daño cerebral.

[0035] Adicionalmente pueden considerarse datos clínicos para sustentar la determinación de la enfermedad/del trastorno.

[0036] Se usaron péptidos sintetizados, de acuerdo con la presente memoria descriptiva, para producir antígenos y los mismos se inyectaron en animales para inducir anticuerpos contra la proencefalina. Para alcanzar este objetivo pueden

ser usados por los expertos en la materia distintos métodos. En una realización preferida se usó hemocianina de *Limus polyphemus* para la inmunización de ovejas y ratones. En otra realización preferida se produjeron anticuerpos monoclonales según métodos conocidos para los expertos en la materia. En una realización preferida se usó hemocianina de *Limus polyphemus* para la inmunización de ratones, efectuándose a continuación la fusión de linfocitos del bazo de los ratones inmunizados con una línea celular de mieloma para producir anticuerpos monoclonales.

[0037] En una realización preferida de la invención se sintetizaron cuatro secuencias de aminoácidos P571, PTE18, PRR16, PDR18 (IDs de Secuencia 2-5, véase la Fig. 1) de proencefalina. Estas secuencias están comprendidas en la secuencia de proencefalina (ID de Secuencia 1). La secuencia de proencefalina está comprendida en la ID de Secuencia 1, la ID de Secuencia 2 comprende el péptido usado para la producción de anticuerpo anti-P571, la ID de Secuencia 3 comprende el péptido usado para la producción de anticuerpo anti-PTE18, la ID de Secuencia 4 comprende el péptido usado para la producción de anticuerpo anti-PRR16, y la ID de Secuencia 5 comprende el péptido usado para la producción de anticuerpo anti-PDR18. A cada péptido se le adicionó un residuo de cisteína amino-terminal. Los péptidos se conjugaron en una hemocianina de *Limus polyphemus* y se produjeron anticuerpos para PTE18, PRR16 y PDR18 en ovejas, y anticuerpos monoclonales para P571 en ratones según métodos conocidos.

[0038] Se purificaron anticuerpos según métodos conocidos, en una realización preferida de la invención, esto se logró preferentemente por cromatografía de afinidad ligando-específica acoplado los péptidos por medio del residuo de cisteína amino-terminal a Gel SulfoLink de Pierce (Boston, EE.UU.) según los métodos de Pierce.

[0039] En una realización preferida, los anticuerpos se etiquetaron con un marcador para permitir su detección. El marcador que se usa es preferiblemente un marcador luminiscente y, en una realización todavía más preferida, el anticuerpo contra PTE18 se etiquetó con un marcador luminiscente.

[0040] La invención, en una realización todavía más preferida, implica el uso de los anticuerpos generados, para la detección de proencefalina en fluidos, tejidos u otros biomateriales corporales, así como un kit que comprende una cierta cantidad de dicho anticuerpo o más anticuerpos específicos para detectar proencefalina.

[0041] Los métodos para la detección de la unión del anticuerpo a la molécula respectiva son también conocidos por los expertos en la materia. En una realización de la invención, la unión del anticuerpo a la diana (que contiene proencefalina) es detectada por luminiscencia.

[0042] Una realización preferida de la invención da a conocer el uso de anticuerpos generados contra P571, PTE18, PRR16 y PDR18. Se usaron distintas combinaciones de anticuerpos (Tabla 1) para la detección de proencefalina en individuos de control, en plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de pacientes con sepsis y en fluido de controles sanos, véase la Fig. 4. Se muestran en la Tabla 1 los fragmentos de proencefalina detectados por los anticuerpos.

[0043] La invención permite además la determinación de la presencia y estabilidad de proencefalina en fluidos, tejido y otros biomateriales corporales, y de la diferencia de concentración de proencefalina en controles sanos y pacientes con varias enfermedades/trastornos.

[0044] En una realización la invención se basa en y hace uso de la estabilidad a largo plazo, descubierta, de la proencefalina y la huella de encefalina *ex vivo* en plasma (Fig. 3a). En plasma la proencefalina y la huella de encefalina sorprendentemente tienen una vida media de más de 24 horas. La proencefalina y la huella de encefalina son asimismo estables en fluido.

[0045] La solicitud da a conocer que la vida media *in vivo* de la proencefalina es sorprendentemente de forma aproximada 24 horas, en comparación con la vida media de la encefalina.

[0046] Así, la proencefalina, como la huella de encefalina, es, en mucho, a efectos diagnósticos, más adecuada que encefalinas maduras que tienen una vida media de tan sólo 12 a 15 minutos en plasma y de dos minutos *in vivo*.

[0047] La invención usa además la correlación de proencefalina y encefalina madura tal como Met-ENK en el estado de enfermedad/trastorno en fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales, sangre, plasma y fluido (*liquor*) en particular.

[0048] En una realización de la invención se muestra (véanse la Fig. 4 y el ejemplo 4) el nivel de reactividad inmune de proencefalina con las tres combinaciones de anticuerpos de la Tabla 1 de plasma de control, plasma de sepsis, plasma de enfermedad de Alzheimer y fluido de controles sanos. En el plasma de los controles y de los pacientes con sepsis y Alzheimer pudo detectarse proencefalina usando la totalidad de las tres combinaciones de anticuerpos. Se ve que la ENK-fp en fluido presenta con mucho la concentración más alta y presenta una señal más de 100 veces más alta que en el plasma de controles sanos. También en el plasma de pacientes con sepsis está significativamente incrementada la reactividad inmune de ENK-fp. La señal es aproximadamente 66 veces más alta que en el plasma de control. Los pacientes con Alzheimer presentan una señal incrementada 1,7 veces en comparación con los controles. Las

combinaciones de anticuerpos II y III no presentan ninguna señal detectable en fluido, lo cual lleva a la conclusión de que la proencefalina está plenamente procesada en fluido. En plasma, sin embargo, las combinaciones de anticuerpos II y III presentan señales detectables que están significativamente incrementadas en los controles y en los pacientes con Alzheimer en comparación con las señales de la combinación de anticuerpos I. Los pacientes con sepsis presentan sin embargo una señal más baja en comparación con la combinación de anticuerpos I.

[0049] En una realización preferida, la invención da a conocer la distribución de concentraciones de proencefalina en plasma de individuos de control sanos (Fig. 6). El 95% presentan una reactividad inmune de menos de 109 pg/ml, siendo la mediana de 74 pg/ml.

[0050] La invención da a conocer además un cambio significativo de la concentración de proencefalina en fluidos, tejido y otros biomateriales corporales en enfermedad o trastorno, que comprenden preferentemente las enfermedades/trastornos antes mencionados.

[0051] La solicitud da a conocer el sorprendente descubrimiento de un significativo incremento de 130 veces de proencefalina en fluido en comparación con plasma de controles sanos. En individuos sanos el fluido contiene de 150 a 450 µg de proteína por ml, formándose el 83% en el suero y tan sólo el 17% en el cerebro. La relación más alta fluido-suero conocida hasta la fecha es la de la prostaglandina-D-sintetasa, que tiene un valor de 33. Así, la sorprendentemente alta relación de aproximadamente 130 en la presente invención es significativamente más alta que la relación de todas las otras proteínas. Así, la determinación de la relación de huella de encefalina y huella de encefalina que contiene reactividad inmune sirve como un marcador muy potente en plasma, por ejemplo, para el funcionamiento de la barrera hematoencefálica. Puesto que la concentración de proencefalina tal como huella de proencefalina es más alta el fluido que en plasma, un incremento de proencefalina en plasma indica el deterioro o pérdida de función de la barrera hematoencefálica: el fluido se difunde en el plasma, conduciendo a un incremento de la concentración de proencefalina en plasma. Así, la presente invención en una realización adicional aporta un método y un kit de diagnóstico para los trastornos / enfermedades anteriormente mencionados, teniendo o usando ambos un anticuerpo específico para la proencefalina, en particular la huella de encefalina.

[0052] Otra realización preferida de la invención se refiere a un método y un kit de diagnóstico para someter a ensayo muestras corporales, en particular, plasma con dos anticuerpos específicos para la proencefalina, sus precursores, o fragmentos o combinaciones de los mismos, en particular huella de encefalina.

[0053] La solicitud da a conocer además un incremento significativo de la huella de encefalina en plasma en la inflamación sistémica y en la infección local (Fig. 7). Los pacientes que padecen de enfermedades inflamatorias sistémicas sorprendentemente presentan un valor significativamente incrementado en el 50% de los casos (> 109 pmoles/l), y los pacientes que tienen una infección local presentan una concentración incrementada de huella de encefalina en el 75% de los casos. Los pacientes con malaria tenían concentraciones de ENK-fp que iban desde aproximadamente 181,5 y aproximadamente 434 pmoles/l, en un caso de cefalea el valor era de aproximadamente 148 pmoles/l, y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se midieron respectivamente en dos pacientes 171,5 y 251 pmoles/l.

[0054] La invención da a conocer además el uso de proencefalina y/o sus anticuerpos para una detección/detección precoz, determinación de la severidad, control de la evolución y pronóstico de las enfermedades/trastornos antes mencionados.

Descripción de las Figuras

[0055]

La Fig. 1 muestra la secuencia de proencefalina, los péptidos maduros y las secuencias que se corresponden con los péptidos usados para la producción de anticuerpos. La secuencia de proencefalina se corresponde con la ID de Secuencia 1, la ID de Secuencia 2 comprende el péptido usado para la producción del anticuerpo anti-P571, la ID de Secuencia 3 comprende el péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PTE18, la ID de Secuencia 4 comprende el péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PRR16, y la ID de Secuencia 5 comprende el péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PDR18.

La Fig. 2 muestra la síntesis de neuropéptidos.

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

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

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

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

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

Ejemplo 1**Producción de anticuerpos****(a) Inmunógeno**

[0056] Fueron seleccionadas y sintetizadas por Jerini (Berlín, Alemania) cuatro secuencias peptídicas distintas (P571, PTE18, PRR16 y PDR18, véase la Fig. 1) de proencefalina. Los péptidos P571 y PTE18 comprenden la secuencia de la huella de encefalina. El PDR18 comprende 15 de 22 aminoácidos del péptido maduro encelutina. Cada péptido estaba provisto de un residuo de cisteína amino-terminal (Cys0).

(b) Anticuerpos

[0057] Para la inmunización los péptidos PTE18, PRR16 y PDR18 se conjugaron con la hemocianina de *Limulus polyphemus*, y se produjeron anticuerpos policlonales en ovejas por Ltd. Micropharm (Carmarthenshire, Gran Bretaña). Para la producción del anticuerpo monoclonal contra el péptido P571 de PENK en ratones, el péptido se conjugó con la hemocianina de *Limulus polyphemus* por BioGenes (Berlín, Alemania). Linfocitos del bazo de ratones inmunizados fueron fusionados con una línea celular de mieloma, y se produjeron anticuerpos monoclonales usando cultivos celulares.

Ejemplo 2**Purificación de anticuerpos**

[0058] Los anticuerpos policlonales de oveja fueron purificados usando purificación por afinidad ligando-específica. Para ese paso los péptidos con Cys(0) PTE18, PRR16 y PDR18 se unieron a Gel SulfoLink suministrado por Pierce (Boston, EE.UU.). La unión se produjo según el protocolo de Pierce.

[0059] En resumen, columnas de polycarbonato (de 15 x 80 mm) se llenaron con 5 ml de matriz de afinidad. Tras el equilibrado de las columnas con PBS (solución salina tamponada con fosfato: NaCl 136mM, KH₂PO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄*2H₂O 20,4mM, KCl 2,7mM, pH 7,2), 5 mg del péptido respectivo se disolvieron en PBS aplicada a las columnas cerradas, y el material del gel se homogeneizó mediante rotación lenta. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y sedimentación del material del gel, las columnas fueron lavadas 5 veces con 3 ml de PBS. Para saturar las posiciones de unión libre 5 ml de una solución de L-cisteína 50mM fueron añadidos al material de la columna, y el material del gel tras homogeneización fue incubado de nuevo por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la sedimentación del material del gel cada columna fue lavada 6 veces con 5 ml de una solución de NaCl 1M, efectuándose a continuación un lavado con PBS.

[0060] El material del gel fue mezclado con 25 ml de las reservas respectivas de antisuero e incubado durante la noche a temperatura ambiente mediante rotación lenta. La mezcla de suero-gel se adicionó a columnas de polycarbonato y el suero sobrante fue eliminado. Las columnas fueron entonces lavadas con 250 ml de PBS para eliminar proteínas séricas no unidas. La desorción de anticuerpos no unidos se efectuó mediante elución de la columna con ácido cítrico 50mM (pH 2,2). El eluato fue capturado en fracciones de 1 ml. La concentración de proteína de cada fracción fue determinada usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Perbio (Bonn, Alemania), y se combinaron las fracciones con un contenido de proteína > 1 mg/ml. Los anticuerpos purificados por afinidad fueron retamponados en PBS por medio de diálisis. Se determinó de nuevo el contenido de proteína, y los anticuerpos fueron almacenados a 4°C.

Anticuerpos monoclonales:

[0061] El anticuerpo monoclonal contra el péptido P571 de PENK fue purificado por medio de cromatografía de afinidad con proteína G a partir del sobrenadante celular. Una Columna Eco-plus (de 10 mm x 125 mm) de Kronlab (Sinsheim, Alemania) fue cargada con 25 ml de medio de cromatografía de afinidad Prosep-G de Millipore (Schwalbach, Alemania).

Ejemplo 3**Inmovilización/Etiquetado de los Anticuerpos**

[0062] Los anticuerpos purificados contra los péptidos P571, PRR16 y PDR18 fueron inmovilizados en tubos de poliestírol (Startubes, 12 m x 75 mm, Greiner, Alemania). Para ese procedimiento las soluciones de anticuerpos fueron diluidas hasta una concentración de proteína de 6,7 µg/ml con PBS, y se pipetearon 300 µl por tubo (lo que se corresponde con 2 µg de anticuerpo por tubo). Los mismos fueron incubados por espacio de 20 horas a temperatura ambiente y a continuación se lavaron 3 veces con 4 ml de PBS, respectivamente. Hasta su posterior uso, los tubos se almacenaron a 4°C.

[0063] El anticuerpo contra PTE18 (1 mg/ml en PBS) fue etiquetado con el marcador luminiscente éster de acridinio-N-hidroxisuccinimida (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent, Hennigsdorf, Alemania). Para el procedimiento de etiquetado 200 µl de anticuerpo fueron mezclados con 4 µl de éster de acridinio y se incubaron por espacio de 20 minutos, y los enlaces éster de acridinio libres fueron saturados añadiendo 40 µl de una solución de glicina 50mM. La preparación de etiquetado fue separada del éster de acridinio libre mediante HPLC en una columna de filtración en gel BioSil 400 (BioRad, Munich, Alemania). Se usó PBS como disolvente.

Ejemplo 4

Determinación de la reactividad inmune de proencefalina

[0064] La reactividad inmune de proencefalina fue determinada en plasma usando tres combinaciones distintas de anticuerpos de 5 controles cada una de ellas, pacientes con sepsis y Alzheimer, así como en el fluido de 5 individuos de control.

100 µl de muestra se pipetearon en cada tubo recubierto con anticuerpo, y se adicionaron 20 ng del anticuerpo etiquetado (en 200 µl de tampón de PBS, EDTA 10mM). Los tubos se incubaron por espacio de 20 horas a 4°C, y a continuación el anticuerpo indicador se eliminó lavando 5 veces con 1 ml de PBS. El anticuerpo etiquetado fijado al tubo se cuantificó midiendo la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

[0065] Se muestran en la Fig. 4 las reactividades inmunes relativas medidas de las distintas combinaciones de anticuerpos.

[0066] En el plasma de controles y de pacientes con sepsis y con Alzheimer pudieron detectarse secuencias de proencefalina usando la totalidad de las tres combinaciones de anticuerpos. El valor medio de los datos de control de la combinación de anticuerpos I se calibró al 100% para una mejor comparación de los resultados, y los valores medios de los datos restantes tomaron como referencia ese valor (véase la Tabla 1). Se muestra que la huella de encefalina en fluido presenta con mucho la concentración más alta y presenta una señal 280 veces más alta que la del plasma de controles sanos. También en el plasma de pacientes con sepsis está significativamente incrementada la reactividad inmune de la huella de encefalina. La señal es aproximadamente 66 veces más alta que en el plasma de los controles. Los pacientes con Alzheimer presentan una señal 1,7 veces mayor en comparación con los controles. Las combinaciones de anticuerpos II y III no presentan una señal detectable en fluido, lo cual conduce a la conclusión de que la proencefalina está plenamente procesada en el fluido. En plasma, sin embargo, las combinaciones de anticuerpos II y III presentaron señales detectables que estaban significativamente incrementadas en los controles y en los pacientes con Alzheimer en comparación con las señales de la combinación de anticuerpos I. Los pacientes con sepsis, sin embargo, presentan una señal más baja en comparación con la combinación de anticuerpos I. Así, esta combinación constituye un método mejor para la diferenciación de pacientes con sepsis y controles.

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

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

*no de acuerdo con las reivindicaciones
IR rel.: inmunorreactividad relativa (valores en % en respuesta al valor en plasma de control de la combinación de anticuerpos I que se calibró al 100%). Todos los valores son valores medios (n = 5).
Relación: relación del valor respectivo del paciente (en %) y el valor de control correspondiente (en %) de la combinación de anticuerpos respectiva.

Ejemplo 5 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa de la huella de encefalina

Componentes:

[0067] Se usaron en el inmunoensayo tubos recubiertos con anticuerpos P571 y el anticuerpo contra PTE-18 etiquetado con un marcador luminiscente. Se describe en el ejemplo 3 la producción de estos componentes.

Procedimiento:

[0068] 100 µl de muestra se pipetearon en cada tubo recubierto con anticuerpo, y fueron añadidos 20 ng del anticuerpo etiquetado (en 100 µl de tampón de PBS, EDTA 10mM). Los tubos fueron incubados por espacio de 20 horas a 4°C, efectuándose a continuación la eliminación del anticuerpo indicador lavando 5 veces con 1 ml de PBS. Los anticuerpos etiquetados fijados al tubo fueron cuantificados midiendo la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

Calibración

[0069] Para poder determinar las concentraciones y las reactividades inmunes de huella de encefalina, el péptido fue sintetizado por Jerini (Berlín, Alemania). El péptido debidamente pesado se usó como calibrador para el ensayo inmune. Se muestra en la Fig. 5 la curva estándar de la huella de encefalina. La sensibilidad analítica del ensayo de la huella de encefalina es aproximadamente 11 pmoles/l.

Ejemplo 6 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

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

[0070] Se muestra en la Fig. 6 la curva de distribución de la concentración de ENK-fp en plasma de individuos sanos. El 95% de los 150 individuos sanos presentan una concentración de ENK-fp en un entorno ajustado entre 40 y 100 pmoles/l.

Ejemplo 7 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

Concentración de ENK-fp en fluido cerebroespinal (CSF)

[0071] Se determinó la concentración de ENK-fp en fluido de muestras de control (n = 39), y se determinó una mediana de 9.623 pmoles/l. La mediana del CSF está significativamente incrementada en un factor de aproximadamente 130 por encima de la mediana del plasma de individuos de control sanos. En individuos sanos el fluido contiene de 150 a 450 µg de proteína por ml, formándose el 83% en el suero y tan sólo el 17% en el cerebro. La relación fluido-suero más alta conocida hasta la fecha es la de la prostaglandina-D-sintetasa, que tiene un valor de 33. Así, la sorprendentemente alta relación de aproximadamente 130 en la presente invención es significativamente más alta que la relación de la totalidad del resto de proteínas. Así, la determinación de la relación de la huella de encefalina y la huella de encefalina que contiene reactividad inmune sirve como marcador plasmático muy potente para el funcionamiento de la barrera hematoencefálica.

Ejemplo 8 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

Determinación de la concentración de ENK-fp en la circulación sanguínea de pacientes que padecen de inflamaciones sistémicas, infecciones locales y otras enfermedades

[0072] Los pacientes que padecían de enfermedades inflamatorias sistémicas presentaron unos valores significativamente incrementados en el 50% de los casos (> 109 pmoles/l, véase la Fig. 7). También los pacientes que tenían una infección local (p. ej. abscesos) presentaron una concentración incrementada de ENK-fp en el 75% de los casos (véase la Fig. 7).

Además se determinaron concentraciones incrementadas de ENK-fp en la enfermedad de Alzheimer, daño cerebral y cardiopatía coronaria en un 75 y un 54% respectivamente (Fig. 7). Pudo detectarse una disminución significativa de la concentración de huella de encefalina en el 75% de pacientes que presentaban una enfermedad intestinal inflamatoria tal como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

Los pacientes con malaria presentaban unas concentraciones de ENK-fp que iban desde aproximadamente 181,5 y aproximadamente 434 pmoles/l, en un caso de cefalea el valor fue de aproximadamente 148 pmoles/l, y en enfermedad pulmonar obstructiva crónica se midieron 171,5 y 251 pmoles/l en dos pacientes respectivamente.

Bibliografía:

[0073]

Starck, M., Danielsson, O., Griffith, A. J., Jörnvall, H., Johannsson, J. (2001): "Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins". *Journal of Chromatography* Vol. 754, págs. 357 a 367

LISTADO DE SECUENCIAS

[0073]

<110> SpingoTec GmbH

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

<130> 4611 PCT

<150> EP 04090191.0

<151> 2004-05-13

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 431 288 T3

Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Gly Leu Lys Arg Ser Pro Gln Leu Glu
 165 170 175
 Asp Glu Ala Lys Glu Leu Gln Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg
 180 185 190
 Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly Gly
 195 200 205
 Phe Leu Lys Arg Phe Ala Glu Ala Leu Pro Ser Asp Glu Glu Gly Glu
 210 215 220
 Ser Tyr Ser Lys Glu Val Pro Glu Met Glu Lys Arg Tyr Gly Gly Phe
 225 230 235 240
 Met Arg Phe
 <210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 2
 Glu Glu Asp Asp Ser Leu Ala Asn Ser Ser Asp Leu Leu Lys
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 3
 Thr Gly Asp Asn Arg Glu Arg Ser His His Gln Asp Gly Ser Asp Asn
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 4
 Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Sintética

5

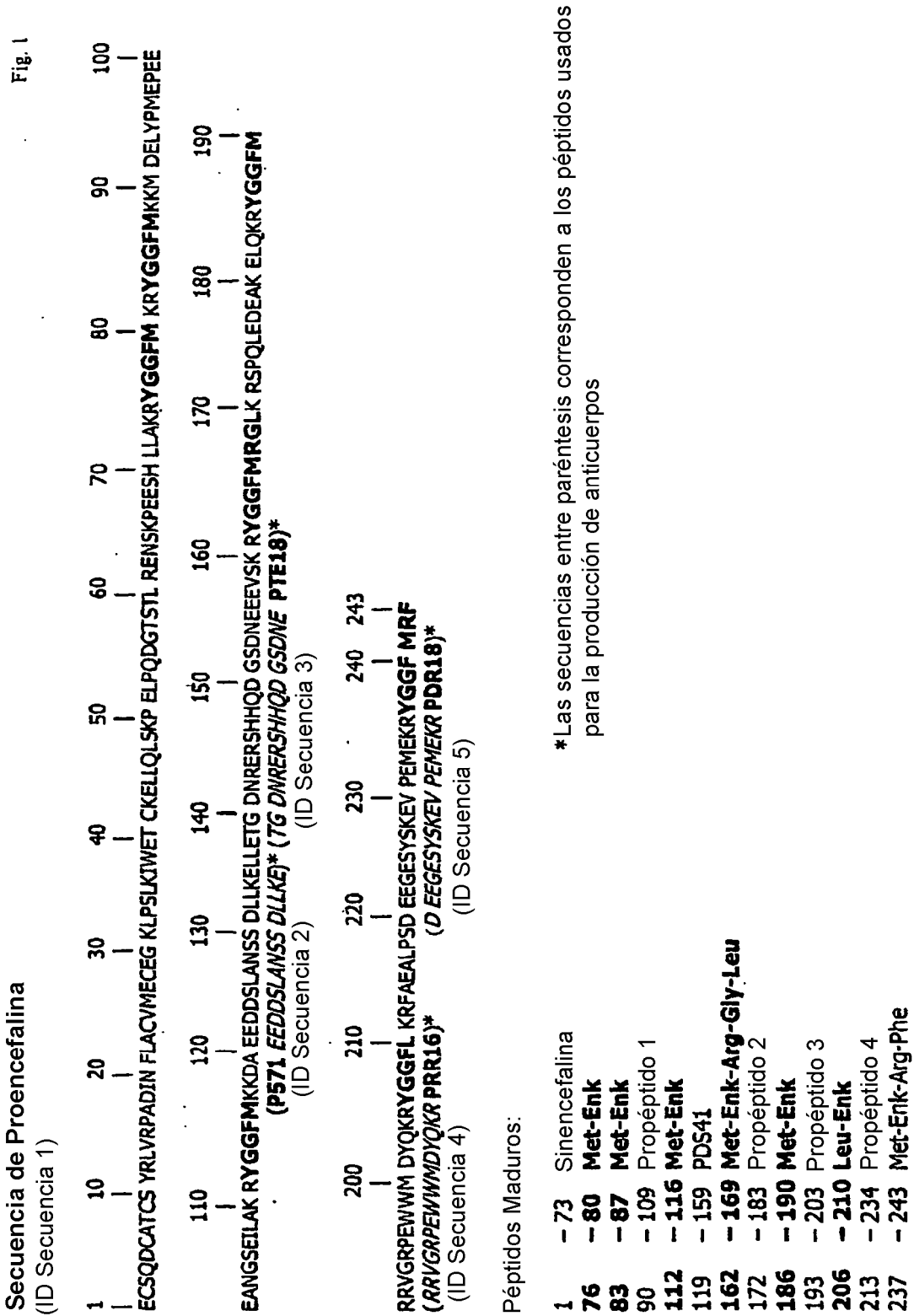
<400> 5

10

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

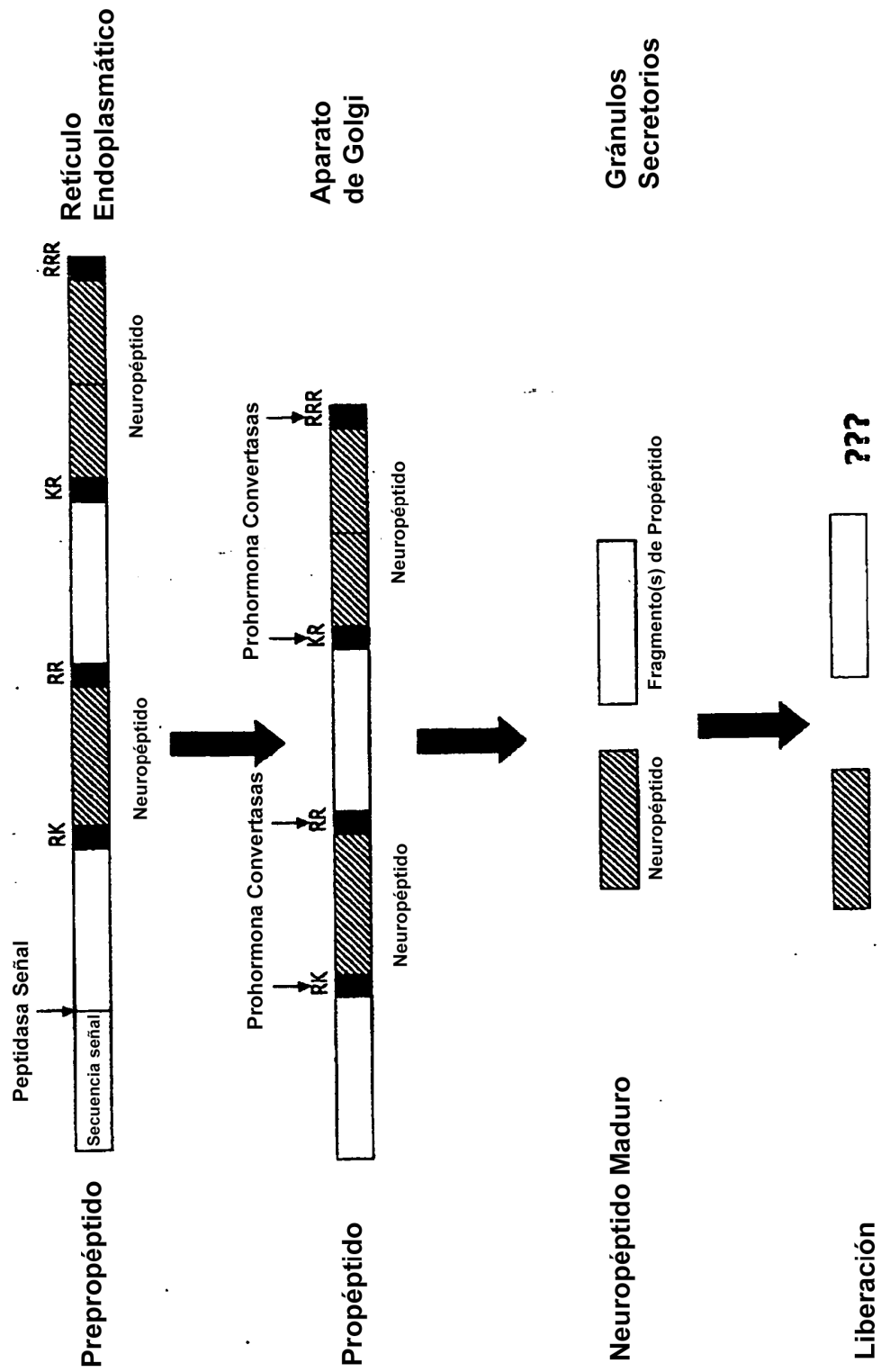
REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la determinación de fragmentos de proencefalina en plasma con fines diagnósticos, en donde se determinan fragmentos de proencefalina que comprenden (i) los aminoácidos de ENK-fp que constan de aminoácidos 119 a 159 de la secuencia de aminoácidos completa de proencefalina según la ID SEC N°: 1 y (ii) aminoácidos adicionales de la secuencia de proencefalina ID SEC N°: 1 que comprende secuencias de aminoácidos ID SEC N°: 4 y/o ID SEC N°: 5, mediante un método inmunodiagnóstico que usa un primer anticuerpo que se une específicamente a dicho fragmento ENK-fp de proencefalina, uniéndose específicamente dicho primer anticuerpo al péptido según la ID SEC N°: 3, en combinación con un segundo anticuerpo que se une a una de las secuencias de aminoácidos según la ID SEC N°: 4 ó la ID SEC N°: 5.
2. Método según la reivindicación 1, en donde dicha determinación se efectúa en plasma para el diagnóstico de sepsis y enfermedad de Alzheimer.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en donde por lo menos un anticuerpo se etiqueta con un marcador detectable.
4. Método según la reivindicación 3, en donde dicho marcador es un marcador luminiscente.
5. Kit para llevar a cabo un método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende dos anticuerpos que se unen a los fragmentos de proencefalina a determinar, en donde el primero de dichos anticuerpos se une específicamente al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 3, y el segundo de dichos anticuerpos se une específicamente a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 4 ó la ID SEC N°: 5.



Síntesis de Neuropeptidos

Fig. 2



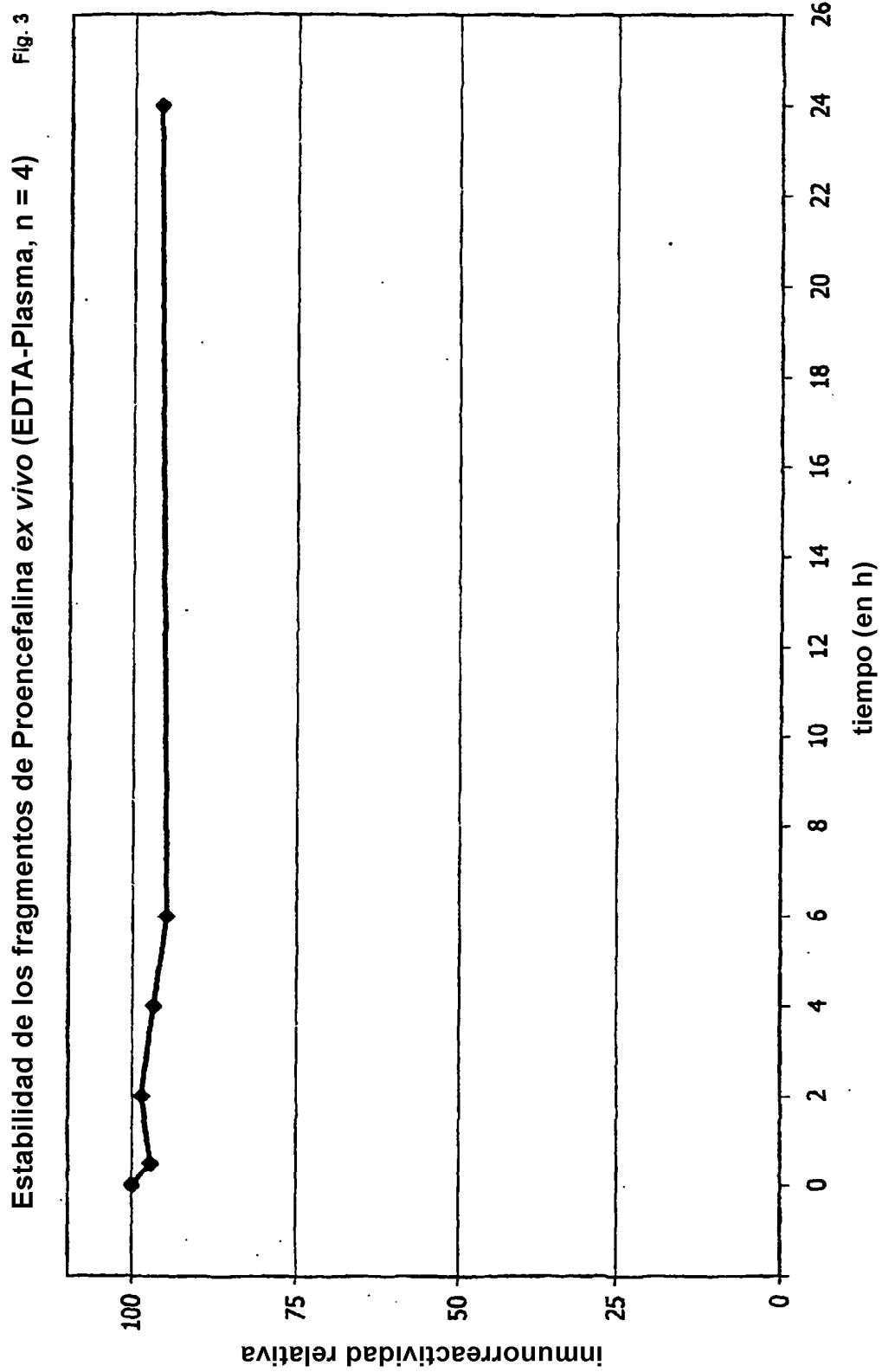
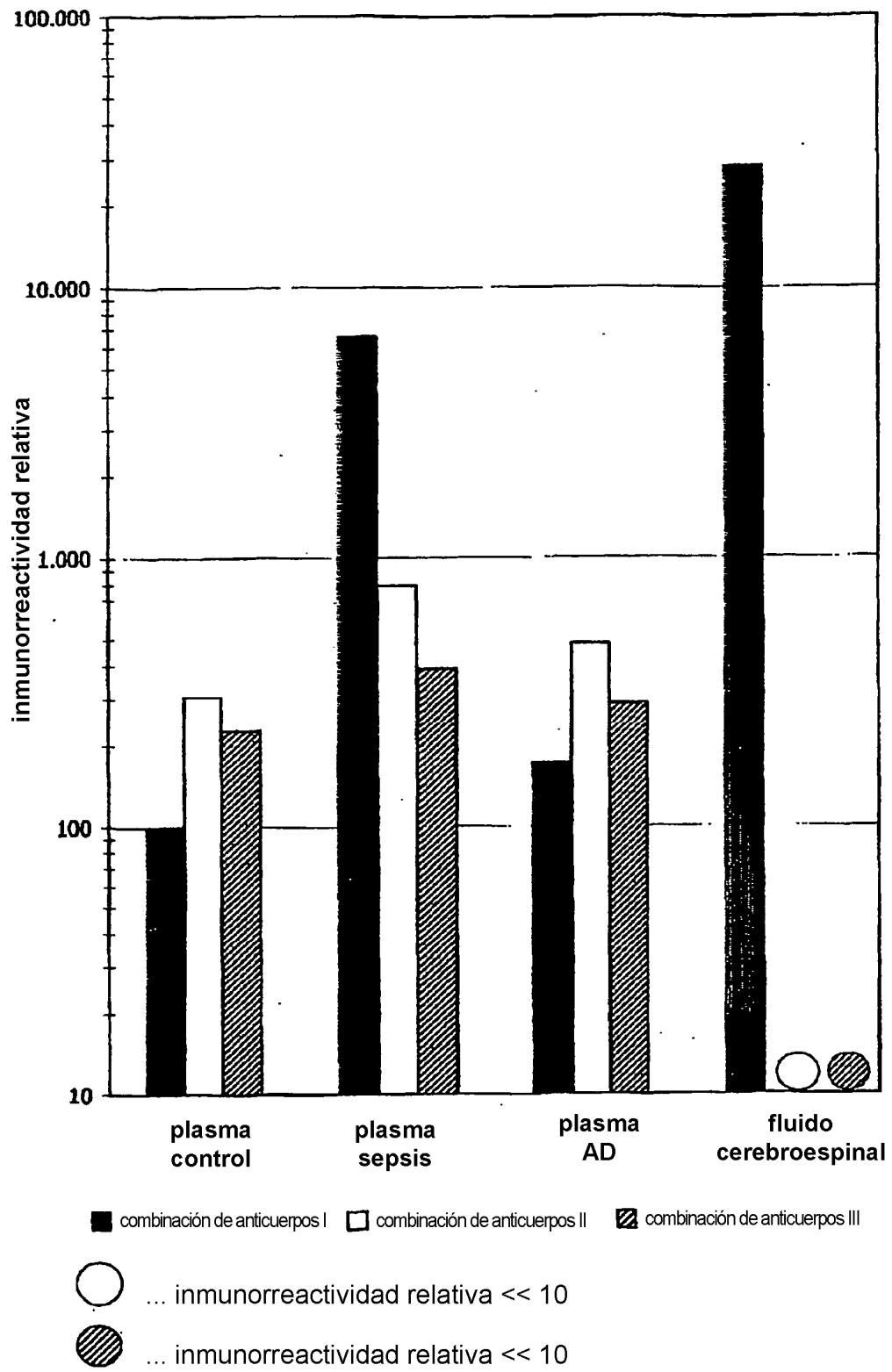


Fig. 4



Curva de calibración

Fig. 5

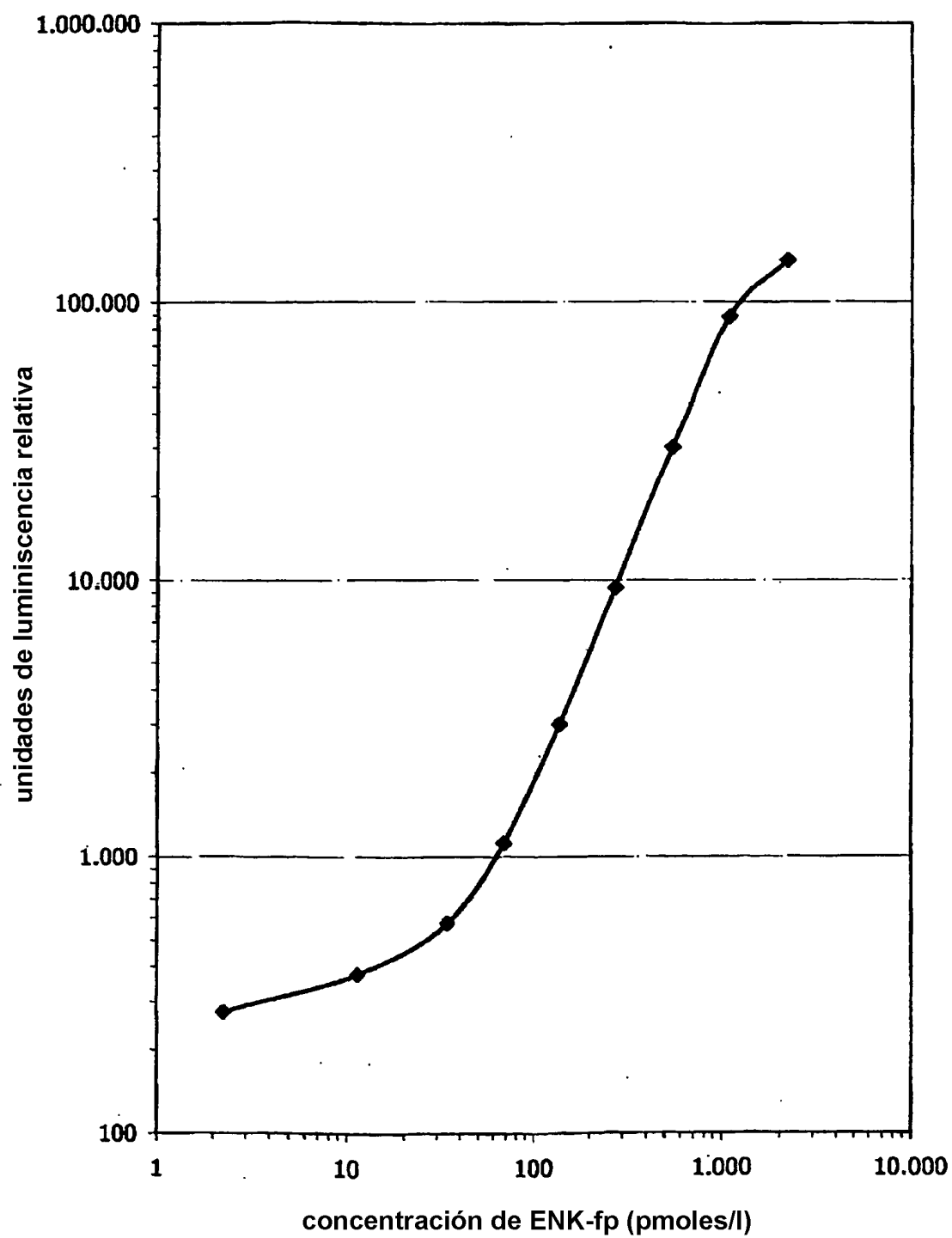


Fig. 6
distribución de frecuencias de la concentración de ENK-fp en plasma de controles
(n = 150)

