



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 030**

51 Int. Cl.:
G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02730067 .2**

86 Fecha de presentación : **26.03.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1373898**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Detección de inflamaciones.**

30 Prioridad: **27.03.2001 DE 101 15 083**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **ScheBo Biotech Aktiengesellschaft**
Netanyastrasse 3-5
35394 Giessen, DE

72 Inventor/es: **Schlatterer, Bert;**
Baekker, Regine;
Scheefers-Borchel, Ursula y
Scheefers, Hans

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Detección de inflamaciones.

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la detección de procesos inflamatorios. El presente invento se refiere en particular a un procedimiento para la detección de procesos inflamatorios en el tejido de glándulas lácteas de seres humanos y animales, en particular de vacas, así como a un estuche de ensayo para la realización del procedimiento conforme al invento. El procedimiento se adecua en particular para la detección específica de inflamaciones en glándulas lácteas, por ejemplo mediante examen de la leche, determinándose cualitativa o cuantitativamente la enzima
10 prostaglandina D sintasa (PGDS), que participa en el suceso inflamatorio.

Las inflamaciones de la glándula láctea de una vaca tienen una gran importancia económica debido a su frecuente presentación en aproximadamente un 30 - 40% de todas las vacas lecheras. Por una parte, mediante tales inflamaciones disminuye el rendimiento de leche y la calidad comercializable de la leche. Por otra parte, un reconocimiento
15 demasiado tardío y el masivo tratamiento con antibióticos, que es necesario a continuación de éste, dan lugar a unos tiempos de espera, en los que la leche no se puede comercializar. Suponiendo una pérdida de 10% del rendimiento de leche en un 15% de las vacas lecheras en la República Federal Alemana, un rendimiento medio de leche de 6.500 kg y un precio por kilogramo de 0,45 DM (marcos alemanes), se puede calcular por lo menos una merma económica de aproximadamente 210 millones de DM por año.

20 Todos los procesos de diagnóstico aplicados hasta ahora para la detección de inflamaciones de las glándulas lácteas son inespecíficos y no permiten ninguna estimación directa de los procesos inflamatorios en la glándula láctea. Entre estos procedimientos conocidos se cuentan, por ejemplo, la medición de la conductibilidad eléctrica de la leche, la determinación de los números o cómputos de células o la detección de enzimas que indican un daño que ya se ha producido en el tejido, tales como p.ej. la lactato deshidrogenasa. La detección de tales enzimas es posible sin embargo
25 tan sólo relativamente tarde.

Los ensayos rápidos disponibles actualmente para su aplicación en el sitio de uso (*in situ*) son ensayos indirectos y están basados en la detección cualitativa o bien semicuantitativa de un ácido desoxirribonucleico, que es liberado
30 desde las células contenidas en la leche, y que se evalúa visualmente. Un número aumentado de células, que produce una elevación de la cantidad de ácido desoxirribonucleico, se considera en este contexto como un indicador de una inflamación en la glándula láctea. Mientras que el ensayo proporciona un indicio acerca del cómputo de células, sin embargo, un contenido aumentado de células no se puede atribuir directamente a procesos inflamatorios, tales como, por ejemplo, la deficiencia grandemente positiva que se observa, por ejemplo, al principio y al final de la lactación.

35 Puesto que las inflamaciones de la glándula láctea son debidas casi exclusivamente a infecciones bacterianas, debería de corresponderle una gran importancia al diagnóstico bacteriológico. No obstante, la práctica muestra que entre las citadas modificaciones inespecíficas en la leche y la bacteriología raramente correlaciones. Un diagnóstico, sobre todo, de inflamaciones subclínicas es, por lo tanto, hasta ahora muy inseguro. Ejemplos de indicadores proteínicos
40 funcionales de una mastitis subclínica son, por ejemplo, LDH, NAGasa (Zank W., Schlatterer B. Assessment of subacute mammary inflammation by soluble biomarkers in comparison to somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows (Evaluación de una inflamación subaguda de las glándulas lácteas mediante marcadores biológicos solubles, en comparación con cómputos de células somáticas en muestras de leche de cuartos partes de vacas lecheras). J Vet Med A 1998; 45:45-51), plasminógeno y plasmina (Urech E., Puhan Z., Schällibaum M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis (Cambios en la fracción proteínica de la leche como se afecta por la mastitis subclínica). J Dairy Sci 1999; 82:945-951), así como el marcador C5a (Rainard P., Poutrel B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows (La generación del fragmento C5a del complemento en la leche es variable entre vacas). J. Dairy Sci 1999; 82:2.402-2.411).

50 Las inflamaciones son provocadas por mediadores de inflamaciones, por regla general después de una iniciación por medio de productos bacterianos del metabolismo. Unos primeros procesos se deben en este caso a un metabolismo elevado localmente de los fosfolípidos, que conduce a prostaglandinas y a productos metabólicos similares a las prostaglandinas. Éstos son ciertamente detectables en la secreción láctea de una glándula láctea inflamada, pero hasta ahora no se han detectado ni reconocido modelos de composición de sustancias estimables inequívocamente, lo
55 que tiene que ver, entre otras cosas, con el carácter complicado y el gasto de la analítica (F. Atroshi y colaboradores, Inflammation-related changes in cyclic AMP and cyclic GMP in bovine mastitis (Cambios relacionados con inflamaciones en AMP cíclico y GMP cíclico en una mastitis bovina). Vet Res Commun 1989; 13: 427-33; O. O'Sullivan y colaboradores. Analysis of prostaglandin D2 metabolites in urine: comparison between enzyme immunoassay and negative ion chemical ionisation gas chromatography-mass spectrometry (Análisis de metabolitos de la prostaglandina D2 en la orina: comparación entre un inmunoensayo enzimático y una espectrometría de masas con cromatografía de gases por ionización química de iones negativos). Prostaglandins Other Lipid Mediat 1999; 57:149-165).

Una misión del invento fue, por lo tanto, poner a disposición un procedimiento y, en particular, un indicador específico de inflamaciones, para la detección de inflamaciones de las glándulas lácteas.
65

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante un procedimiento para la detección de una inflamación de las glándulas lácteas, que está caracterizado porque se determinan cualitativa y/o cuantitativamente la enzima prostaglandina D sintasa (PDGS) o fragmentos parciales de la misma. La determinación se efectúa preferiblemente en

líquidos corporales. Se comprobó que la prostaglandina D sintasa (PGDS) sube en el caso de procesos inflamatorios en el cuerpo o en un tejido de seres humanos y animales. La PGDS se puede encontrar, en el caso de inflamaciones, en una cantidad aumentada en líquidos corporales, por ejemplo en el plasma, en el líquido sinovial, en el fluido cerebrospinal, en la orina o en la eyaculación. La prostaglandina D sintasa (PGDS) se adecua, por consiguiente, como un indicador de inflamaciones en procesos inflamatorios, puesto que la cantidad de la enzima sube en el caso de inflamaciones. La determinación se puede efectuar también en las heces y sirve entonces para la detección de inflamaciones en el tracto gastrointestinal, en particular en el estómago, el páncreas o los intestinos.

El invento se refiere a un procedimiento para la detección de una inflamación de las glándulas lácteas, que está caracterizado porque se determinan cualitativa y/o cuantitativamente la enzima prostaglandina D sintasa (PGDS) o fragmentos parciales de la misma.

Se comprobó que la prostaglandina D sintasa (PGDS) es segregada en cantidad aumentada en el caso de inflamaciones de las glándulas lácteas, de tal manera que esta enzima se adecua como un indicador de inflamaciones para la detección específica cualitativa o/y cuantitativa de inflamaciones de las glándulas lácteas.

Conforme al invento, se pone a disposición, por consiguiente, un indicador de alta especificidad, acoplado directamente a los procesos inflamatorios, cuya detección y cuya cuantificación permiten también un diagnóstico precoz de inflamaciones de las glándulas lácteas. La enzima indicadora prostaglandina D sintasa (número de acceso O02853) se presenta en varias isoformas, que se pueden detectar individualmente o en común.

La sustancia indicadora PGDS para la detección de una inflamación de las glándulas lácteas se descubrió mediante comparación del modelo de composición de proteínas del suero lácteo de la leche de animales afectados por una inflamación de las glándulas lácteas, con el de animales sanos, que no están afectados. Este modelo de composición de proteínas se puede obtener, por ejemplo, mediante una electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE), habiendo aparecido, en el caso de muestras de leche de animales con una inflamación de las glándulas lácteas, 4 manchas adicionales con un peso molecular de aproximadamente 26 kDa y con un intervalo de valores del pH de 5,0 a 6,4. Las sustancias recortadas a partir del gel muestran un modelo de composición muy similar, en cromatografía así como en espectrometría de masas, de péptidos quimiotripticos (cortados con quimiotripsina). Mediante una búsqueda en un banco de datos se pudieron identificar las 4 sustancias como isoformas de la prostaglandina D sintasa (PGDS) bovina, estando oxidado en una de las isoformas un resto de cisteína para dar un ácido sulfónico.

Por consiguiente, a pesar de la naturaleza muy compleja de los mecanismos de defensa e inflamación de las glándulas lácteas contra la invasión de diferentes agentes infecciosos, se ha conseguido poner a disposición un marcador, que permite de una manera fiable una detección cualitativa y/o cuantitativa de una inflamación de las glándulas lácteas. A causa de la gran cantidad de caseínas en la leche, se realizó un fraccionamiento previo de las proteínas de una leche de vaca en lo que respecta a los componentes del suero lácteo, con lo que se pudo obtener un esclarecimiento en cuanto a los polipéptidos, que permite la identificación de la enzima marcadora PGDS conforme al invento.

Sorprendentemente, esta molécula marcadora se pudo detectar no solamente en la sangre, o dentro de las células, en el caso de una inflamación de las glándulas lácteas, sino que, en el caso de inflamaciones de las glándulas lácteas, se presenta también en la leche en una cantidad elevada, de tal manera que es posible una detección sencilla y fácil de una inflamación de las glándulas lácteas. Además, la enzima se pudo detectar, en el caso de inflamaciones, en una cantidad elevada en líquidos corporales, p.ej. en el caso de una encefalitis en una cantidad elevada en el fluido cerebrospinal y, en el caso de una artritis reumatoide, en el líquido sinovial. La prostaglandina D sintasa del tipo de lipocalina, que también se designa como prostaglandina H2-D-isomerasa (EC5.3.99.2), es una enzima fijada a membranas (Giacomelli S, Leone MG, Grima J, Silvestrini B, Cheng CY. Astrocytes synthesize and secrete prostaglandin D synthase *in vitro* (Los astrocitos sintetizan y segregan la prostaglandina D sintasa *in vitro*). Biochim Biophys Acta 1996; 1.310:269-276).

Fundamentalmente, el procedimiento conforme al invento se puede emplear para la detección de inflamaciones en seres humanos y animales.

Mientras que el procedimiento conforme al invento se puede emplear para la detección de una inflamación de las glándulas lácteas en seres humanos y animales, se emplea de una manera especialmente preferida para la detección de inflamaciones de las glándulas lácteas de vacas. Preferiblemente, se determinan la enzima prostaglandina D sintasa o fragmentos parciales de la misma, en particular fragmentos parciales con una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, de manera más preferida de por lo menos 30 aminoácidos, y de manera todavía más preferida de por lo menos 50 aminoácidos, en una muestra de líquido corporal o preferiblemente en una muestra de leche. En el caso de la detección en seres humanos se utiliza como marcador en particular la prostaglandina D sintasa humana, y en el caso de la detección en vacas se utiliza especialmente la prostaglandina D sintasa bovina.

La determinación del marcador en una muestra de leche permite *in situ* una rápida y sencilla estimación acerca de si se presenta una inflamación o bien de con qué intensidad está pronunciada una inflamación.

De manera especialmente preferida, la determinación se lleva a cabo mediando utilización de por lo menos un anticuerpo dirigido contra la prostaglandina D sintasa. Anticuerpos aptos para emplearse conforme al invento se pueden producir de acuerdo con procedimientos conocidos a partir del estado de la técnica. Para un experto en la especialidad

son bien conocidos los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales y respectivamente policlonales. Para la producción de anticuerpos monoclonales por ejemplo el antígeno, en el presente caso por lo tanto la enzima prostaglandina D sintasa o fragmentos parciales de la misma, se utilizan en una forma purificada de una manera usual para la producción de anticuerpos. En principio, para esta finalidad se puede aplicar el procedimiento, que fue descrito por primera vez por Köhler y Millstein, siendo conocidos para un experto en la especialidad también modificaciones y perfeccionamientos de este procedimiento. La selectividad de los anticuerpos obtenidos se puede comprobar mediante selección.

También es posible, partiendo de la prostaglandina D sintasa o de fragmentos parciales de la misma, producir anticuerpos policlonales de acuerdo con procedimientos conocidos. Se emplean preferiblemente aquellos anticuerpos policlonales, en particular los anticuerpos policlonales que reconocen a todas las isoformas de la prostaglandina D sintasa.

De manera especialmente preferida, el anticuerpo se produce mediante utilización de los péptidos PGDS1 (Ac-LTSTFLRKDQCETRTLL-NH₂), PGDS2 (Ac-FEEDKFLGR-WFTSGLAS-NH₂) o PGDS3 (Ac-GPGQDFRMTALY-SRSQ-NH₂).

La determinación se lleva a cabo preferiblemente mediante un inmunoensayo, en particular mediante un ELISA en emparejado cuantitativo. En una forma preferida de realización de este ensayo, una muestra, por ejemplo una muestra de leche que se ha de ensayar, se pone en contacto con por lo menos dos receptores diferentes, de los que el primer receptor R1 se presenta inmovilizado junto a una fase sólida y es capaz de fijarse con la PGDS y el segundo receptor R2 se presenta en una fase líquida y es asimismo capaz de fijarse con la PGDS, y lleva una marcación, o media en la fijación a una molécula detectable, se separa la fase sólida con respecto de la fase líquida y se determina la marcación o la molécula detectable en la fase sólida. Mediante cuantificación de la cantidad determinada de marcación o de la molécula detectable, se puede cuantificar la cantidad de PGDS presente en la muestra.

En otra forma preferida de realización, el procedimiento conforme al invento se lleva a cabo como una transferencia de borrón (blot) Western.

Al llevar a cabo un inmunoensayo se puede comprobar específicamente el contenido de la PGDS en una muestra, por ejemplo en una muestra de leche, el cual se puede considerar como marcador para una inflamación de las glándulas lácteas. Junto a la determinación cuantitativa, también es posible una determinación cualitativa, a fin, p.ej., de obtener de antemano un resultado rápido. Preferiblemente, se establece un valor de corte (en inglés cut-off), a fin de poder diferenciar entre resultados negativos y resultados positivos.

En una forma preferida de realización, en primer lugar, un anticuerpo que se fija específicamente a la enzima PGDS es inmovilizado junto a una fase sólida por medio de un procedimiento conocido. La muestra que se ha de examinar, en particular una muestra de leche, después de haberla desnatado en una solución tamponadora apropiada, es puesta en contacto con el anticuerpo fijado y es fijado a través de éste a la fase sólida. Después de haber lavado el complejo inmovilizado, así obtenido, entre el anticuerpo y la enzima, se añade un anticuerpo secundario adicional, acoplado con un marcador, que es fijado a otro epítipo de la PGDS, y se determina la cantidad del marcador que queda en el sistema. La cantidad del marcador fijado es directamente proporcional a la cantidad de PGDS en la muestra. Preferiblemente, el procedimiento conforme al invento se lleva a cabo paralelamente con un material de referencia que tiene diferentes concentraciones de PGDS en muestras de líquidos corporales, en particular en muestras de leche, a fin de poner a disposición un alto grado de seguridad analítica y de exactitud.

Con el procedimiento conforme al invento se pueden detectar y cuantificar tanto una inflamación incipiente de las glándulas lácteas, así como también una inflamación ya existente. Además, el procedimiento es específico y fácil de llevar a cabo. El procedimiento conforme al invento se adecua, además de esto, no sólo para la realización en un laboratorio, por ejemplo como un procedimiento cuantitativo de ensayo, sino que se puede ejecutar también como una variante de ensayo rápido, que permite estimar *in situ* la localización y la gravedad de una inflamación.

Junto a la realización del procedimiento conforme al invento en forma de un inmunoensayo y en particular de un ELISA o de una transferencia de borrón Western, la detección de una PGDS, por ejemplo, en la leche, es posible también con ayuda de otros procedimientos de detección, prefiriéndose en particular la detección con ayuda de una espectroscopia de masas, en particular la MALDI-TOF (espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción/ionización mediante láser, asistida por una matriz) o mediante una electroforesis en gel, en particular una electroforesis bidimensional en gel. Junto a esto, la concentración del analito se puede determinar en principio también por medio de sensores biológicos (biosensores), tales como p.ej. sensores amperométricos, potenciométricos, piezoelectrónicos, termométricos o fotométricos, o también mediante electrodos con semiconductores, tales como transistores de efecto de campo (FIT), transistores de efecto de campo quimiosensibles (CHEMFET), transistores de efecto de campo con puerta suspendida (SGFET) o transistores de efecto de campo sensibles a los iones. Tales biosensores se han descrito, por ejemplo, por E. A. H. Hall y G. Hummel en la obra "Biosensoren", editorial Springer Heidelberg, Alemania, 1995. Además, la detección se puede llevar a cabo mediante la tecnología del candelabro de IBM, Inc. Una realización especialmente ventajosa del procedimiento, en lo que respecta a la sensibilidad, al intervalo dinámico de medición, a la cinética de los análisis y a la flexibilidad del formato, se puede conseguir mediante utilización de la tecnología de electroquimioluminiscencia. Por electroquimioluminiscencia se entiende un proceso en el que se libera luz. La liberación de luz es inducida mediante el recurso de que se aplica un potencial eléctrico a un electrodo, que

media en una reacción redox cíclica de un ion de rutenio metálico (Bruno, G. (1997) Rec. Rp. páginas 175-179; Williams R. (1996), Amer. Biotech, página 26). Una similar tecnología apropiada es la tecnología TRACE de la entidad CIS, Alemania.

El procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo por medio de un estuche de ensayo para la detección o/y para el diagnóstico de una inflamación de las glándulas lácteas, que contiene por lo menos un receptor que se fija con la prostaglandina D sintasa, estando estructurado el estuche de ensayo, en particular, para la realización del procedimiento conforme al invento. El estuche de ensayo está previsto en particular para la detección en vacas, pero puede estar previsto también para la detección en los casos de otros animales o de seres humanos.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo policlonal, que se fija a varias, preferiblemente a la totalidad, de las isoformas de la prostaglandina D sintasa.

El receptor que se fija a la enzima PGDS media preferiblemente en la fijación a una fase sólida, de tal manera que se hace posible una separación de una fase líquida, que contiene la muestra, en particular una muestra de leche, y de una fase sólida con la PGDS fijada a ella a través de un receptor. Esta fase sólida es, en una forma preferida de realización, asimismo parte componente del estuche de ensayo. La muestra que se ha de examinar se pone en contacto entonces, en una solución tamponadora apropiada, con el receptor fijado o capaz de fijarse, en particular un anticuerpo, y se fija a la fase sólida por medio del receptor. En el caso de utilizarse la leche como muestra, antes de esta etapa se lleva a cabo preferiblemente un desnatado.

Después de haber lavado el complejo inmovilizado obtenido entre un anticuerpo y la PGDS, se añade entonces otro anticuerpo secundario marcado o capaz de fijarse a una molécula detectable, p.ej. provisto de biotina, el cual se fija preferiblemente a otro epítipo de la PGDS. A continuación, se puede determinar la marcación, p.ej. con ayuda de la estreptavidina peroxidasa. La cantidad del marcador fijado es directamente proporcional a la cantidad de PGDS en la muestra. Convenientemente, el estuche de ensayo contiene un material de referencia con un contenido conocido, y en particular con diferentes concentraciones de la PGDS, para la determinación cuantitativa y para el aseguramiento de la calidad del análisis.

Junto a la forma de realización preferida como un ensayo en emparedado en fase sólida, el procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo también por medio de otros métodos de detección. En particular, se pueden emplear conforme al invento todos los tipos de procedimientos inmunológicos de detección, que se llevan a cabo con ayuda de anticuerpos. Así, el procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo, por ejemplo, como un ensayo ELISA, un ensayo en cuarzo oscilante, un ensayo con microbáscula o un ensayo de electroquimioluminiscencia, y contiene preferiblemente los reactivos, y eventualmente también los dispositivos, necesarios para ello.

Para una manipulación sencilla, el ensayo se puede concebir en forma de una tira de ensayo, sobre la que están dispuestos, por ejemplo en diferentes zonas, los anticuerpos requeridos, o bien en una forma soluble o fijados a fases sólidas. La muestra y respectivamente la porción líquida de la muestra, o un extracto de la misma, pueden migrar entonces a través de la tira de ensayo y proporcionan una señal junto al sitio de detección, cuando la PGDS está presente en la muestra.

En una forma preferida de realización, el ensayo está ejecutado como un ensayo rápido en forma de un ensayo de difusión a través de una membrana, p.ej. como un ensayo de flujo lateral (del inglés Lateral Flow Test) inmunocromatográfico o un ensayo similar.

En el marco del presente invento, la expresión “receptor” y respectivamente la de “anticuerpo” designan también a las partes o fragmentos de receptores y respectivamente anticuerpos, que median todavía en la necesaria fijación a la PGDS. En este caso, también es posible emplear, en vez de un único anticuerpo, un conjugado, por ejemplo a base de dos anticuerpos. En particular, por ejemplo como receptor secundario, se puede utilizar un anticuerpo capaz de fijarse a la PGDS, y llevar a cabo la detección a través de otro anticuerpo marcado, que está dirigido contra la parte Fc del anticuerpo secundario y que lleva una marcación o, por su parte, está acoplado con una molécula detectable. Una tal formación de un conjugado a base de dos anticuerpos debe de estar abarcada dentro del marco de presente invento, cuando el anticuerpo secundario está definido de tal manera que media en la fijación a una molécula detectable. Algo análogo es válido para la fijación del primer anticuerpo a la fase sólida. También esta fijación se puede efectuar a través de anticuerpos acoplados a fases sólidas, los cuales se fijan a la parte Fc del primer anticuerpo.

Dentro del marco del presente invento se prefiere que el estuche de ensayo utilizable contenga como receptores unos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de fijarse específicamente. Además, se prefiere que el primer anticuerpo se presente acoplado a una fase sólida, mientras que el anticuerpo secundario sea preferiblemente un anticuerpo marcado, soluble, o un anticuerpo soluble, que está fijado a una enzima, la cual, por su parte, se puede determinar por medio de una reacción de detección. La marcación se puede estructurar de tal manera que sea reconocible sin más adiciones de sustancias, tales como p.ej. una marcación con oro o una marcación fluorescente, pero también puede estar estructurada de tal manera que una adición de reactivos adicionales haga posible la determinación. Por ejemplo, la detección se puede efectuar mediante una marcación con enzimas y una adición del sustrato enzimático.

Un objeto adicional del presente invento es la utilización de un anticuerpo dirigido contra la prostaglandina D sintasa para la preparación de un agente destinado a la detección de inflamaciones de las glándulas lácteas. Conforme al

invento se comprobó que los anticuerpos dirigidos contra la prostaglandina D sintasa son unos marcadores específicos de inflamaciones de las glándulas lácteas, de tal manera que ellos se pueden emplear tanto para la detección cualitativa como también para la detección cuantitativa de tales inflamaciones.

5 Preferiblemente, en el procedimiento conforme al invento se emplea un anticuerpo monoclonal, que se fija específicamente a la enzima prostaglandina D sintasa (PGDS).

10 Los anticuerpos son obtenibles con ayuda de métodos de por sí conocidos. En este caso, primeramente la enzima prostaglandina D sintasa (PGDS) se aísla y eventualmente se purifica. Después de esto, un animal de ensayo se puede inmunizar con la prostaglandina D sintasa así obtenida y respectivamente con fragmentos de la misma, que tienen los correspondientes epítomos, y los anticuerpos que se han formado se pueden aislar. Los fragmentos, que se utilizan para la inmunización, pueden proceder p.ej. de una digestión con una proteasa de la PGDS purificada, o de péptidos parciales sintéticos de la misma. La preparación de tales péptidos parciales es de por sí conocida para un experto en la especialidad. En este caso, a partir de la secuencia total, p.ej. con ayuda de programas de ordenador, se pueden seleccionar secuencias parciales, que contienen correspondientes epítomos. Estas secuencias se ensayan luego en cuanto a su posibilidad de utilización para la producción de anticuerpos específicos.

15 Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales se producen según el método de Köhler, Milstein (Nature 256, 495-497 (1975)). En este caso se inmunizan, por ejemplo, ratones BALB/c con una PDGS aislada, y las células esplénicas de estos animales se fusionan con un linaje de células de mieloma, por ejemplo, el PA I. Los anticuerpos segregados se ensayan en cuanto a su especificidad, por ejemplo en un ensayo de tipo ELISA o RIA, y se aíslan.

20 Por lo demás, se pueden emplear aptámeros, que se fijan específicamente a la PGDS. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos, que tienen unas propiedades específicas de fijación. Los aptámeros se pueden preparar o identificar, por ejemplo, según los métodos descritos en el documento US 5.270.163 o en la cita de Sumedha, Clin. Chem. 45 (1999) 1.626-1.650.

El invento se explica más detalladamente por medio de las Figuras adjuntas y los siguientes Ejemplos

30 Figura 1

Comparación de modelos de composición de proteínas del suero lácteo de unas cuartas partes de glándulas lácteas inflamadas (Figura 1A) y no modificadas (Figura 1 B), con una SDS-2D-PAGE

35 Cantidades equivalentes (6 mg) de muestras de proteínas liofilizadas se cargaron sobre tiras lineales de IPG (con gradiente de pH inmovilizado) de pH 4-7 y se enfocaron, seguidamente se llevó a cabo una electroforesis en un gel con SDS con una concentración constante de acrilamida (12% de T, 2,67% de C). Las flechas indican las especies de proteínas identificadas, que no están presentes en la cuarta parte no modificada de una ubre. Las manchas designadas con letras representan proteínas identificadas, que se encuentran usualmente en cualquier leche: A: IgG1; B: fragmento de albúmina de suero bovino; C: fragmento de albúmina de suero bovino; D: fragmento de albúmina de suero bovino; E: κ -caseína; F-EPI (proteína secretoria).

Figura 2

45 Separación por HPLC en fase inversa de los péptidos cortados con quimiotripsina, que se obtuvieron mediante digestión de las proteínas de las manchas 2 y 3 en el gel.

Figura 3

50 Espectros de MALDI-TOF en la modalidad de iones negativos de los péptidos cortados con quimiotripsina, que se obtuvieron mediante digestión de las proteínas en las manchas 2 y 3 en el gel. Los espectros son casi idénticos, con la excepción de los péptidos marcados con flechas. En la mancha 3, los péptidos situados a 1.085 y 1.198 Da se asignan a los restos 68 hasta 77 y 67 hasta 77 de la secuencia de PGDS. Las masas de los correspondientes péptidos en la mancha 2 son 9 Da más bajas.

55 Figura 4

Secuencia de PGDS. Los péptidos cortados con quimiotripsina, que se habían observado, se subrayaron. Los péptidos, que son diferentes en las manchas 2 y 3, están impresos en negrita.

60 Figura 5

Transferencias de borrones Western de secreciones de leche procedentes de cuartas partes de ubres que han sido modificadas diferentemente.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Materiales y métodos*

Se examinaron 7 vacas, escogidas sobre la base de un examen bacteriológico, en lo que respecta al cómputo (número) de las células somáticas (SCC) y a la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH). Las muestras previas de leche de cuartas partes infectadas y no infectadas de la misma ubre se cargaron directamente en recipientes con una capacidad de 50 ml, que contenían una combinación de los dos inhibidores de proteinasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 2 mM) y APMSF (hidrocloruro de fluoruro de (4-amidino-fenil)-2-metanosulfonilo, 20 μ M), ambos de la entidad Roche Diagnostics Mannheim, Alemania. Para la determinación de los cómputos de células y de la actividad de LDH se utilizaron muestras previas de leche no entresacadas.

15 1.1 *Análisis y preparación de las fracciones de suero lácteo*

Se midió el SSC con un aparato Fossomatic 360 (de la entidad Foss Electric, Hillerfod, Dinamarca). La actividad de LDH se midió en una leche desnatada con un autoanalizador Beckman Synchron CX5 CE (Zank W, Schlatterer B. Assessment of subacute mammary inflammation by soluble biomarkers in comparison to somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows (comprobación de una inflamación mamaria subaguda mediante biomarcadores solubles en comparación con cómputos de células somáticas en muestras de leche de cuartas partes procedentes de vacas lecheras). J. Vet. Med. A 1998; 454:46-51). Los resultados se expresaron en unidades de LDH (μ mol/s I). Las fracciones de proteínas del suero lácteo se prepararon de acuerdo con el procedimiento de Molloy MP, Herbert BR, Yan JX, Williams KL, Gooley AA. (Identification of wallaby milk proteins separated by two-dimensional electrophoresis, using amino acid analysis and sequence tagging (Identificación de proteínas del suero lácteo separadas por una electroforesis bidimensional utilizando un análisis de aminoácidos y una marcación secuencial). Electrophoresis 1997; 18:1.073-1.078). Dicho brevemente, una separación de grasa de la leche se realizó mediante centrifugación a 5.000 g (g = aceleración de la gravedad), a 4°C durante 10 min. La caseína se precipitó mediante acidificación de una leche desnatada a un pH de 4,6 con ácido acético 4 M y se separó mediante centrifugación a 5.000 g, a 4°C y mediante filtración, primeramente a través de un filtro de papel y luego a través de una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF, 0,2 μ m). El material filtrado se dializó durante una noche a 4°C frente a agua bidestilada. El material no disuelto se separó mediante centrifugación. Se llevó a cabo una determinación de las proteínas de acuerdo con Bradford MH. (A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de proteínas del orden de microgramos mediante utilización del principio de fijación de proteína y colorante). Anal Biochem 1976; 205:22-26) mediante utilización de un ensayo Bio-Rad (de la entidad Hercules, EE.UU.) en cuanto a proteínas. Unas partes alícuotas se liofilizaron y se almacenaron a -70°C.

40 1.2 *Electroforesis bidimensional en gel de poli(acrilamida) (2D-PAGE)*

1.2.1 *Primera dimensión: Enfoque isoeléctrico*

6 mg de proteínas liofilizadas de las fracciones de suero lácteo se disolvieron en 350 μ l de una solución de rehidratación (urea 8 M, CHAPS al 2%, ditioeritritol (DTT) al 0,3%, tampón de IPG al 2%). Immobiline® Dry Strips (tiras secas Immobiline®), de pH 4-7, 18 cm, se introdujeron en un dispositivo Multiphor II (de la entidad Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El enfoque se inició a 500 V. La tensión eléctrica se aumentó escalonadamente en el transcurso de una hora hasta 3.500 V, y se prosiguió el enfoque a 2 mA y 10 W durante 7,5 h.

50 1.2.2. *Segunda dimensión: Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida*

Antes de la segunda dimensión, las tiras de IPG se equilibraron primeramente durante 15 min en 10 ml de un tampón a base de Tris-HCl 50 mM, de pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30% (v/v) [en volumen/volumen], SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 2% (p/v) [en peso/volumen], una traza de azul de bromofenol y ditioeritritol (DDT) 65 mM, y luego durante otros 15 min, en el mismo tampón, siendo reemplazado el DTT por yodoacetamida 260 mM. Sobre un gel de SDS con una concentración constante de acrilamida (12% de T, 2,67% de C, 200x205x1,5 mm) las tiras equilibradas de IPG se embebieron en agarosa al 0,5% en la cara catódica mediante utilización del dispositivo Protean®II horizontal (de la entidad Bio-Rad, Richmond, EE.UU.). Las condiciones de electroforesis fueron 150 V, 15 mA/gel, 10 W a 12°C durante una noche, hasta que el colorante de detección bromofenol apareció en el extremo catódico. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R 350, hasta que se obtuvo la intensidad necesaria de coloración. Se llevó a cabo una descoloración de los geles realizando múltiples veces cambios de una solución de descoloración (etanol al 25%, ácido acético al 8%).

1.3. *Identificación y análisis de las proteínas disueltas en un gel*

65 1.3.1 *Digestión proteolítica de las proteínas en el gel y extracción de los péptidos*

Las manchas de proteínas teñidas se recortaron y se descoloraron durante 2-6 h en una mezcla de acetonitrilo al 40% (v/v) y de NH_4HCO_3 50 mM al 60% (v/v). Después de la desecación mediante una centrifugación en vacío,

éstas se impregnaron con una solución de quimiotripsina (30 ng/ μ l en NH_4HCO_3 50 mM). La digestión se llevó a cabo durante una noche a la temperatura ambiente. Los péptidos se extrajeron mediante una adición de 30 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% seguida por una adición de 50 μ l de acetonitrilo (CH_3CN) después de 10 min. Se separó el material sobrenadante y se repitió una vez más el modo de proceder. Los materiales sobrenadantes combinados se liofilizaron.

1.3.2 RP-HPLC (cromatografía de fase líquida a alta presión en fase inversa)

Separación de los péptidos cortados con quimiotripsina

Los péptidos formados mediante digestión enzimática (con quimiotripsina) se separaron mediante una RP-HPLC (SMART system, Pharmacia, Uppsala, Suecia) en una columna de Pharmacia C2/C18 SC2.1/10, mediando utilización de un gradiente lineal de acetonitrilo (0-50% en 40 min) en TFA al 0,1%. Los péptidos se detectaron a una longitud de onda de 214 nm.

1.3.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se registraron espectros de masas de MALDI-TOF (espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción/ionización mediante láser, asistida por una matriz) en un instrumento Reflex II MALDI-TOF (de la entidad Bruker-Daltonik, Bremen, Alemania). Todos los espectros se registraron en la modalidad de reflector con ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico (15 mg/ml en acetonitrilo al 70%) como matriz. Para el análisis por espectrometría de masas, la mezcla de péptidos se disolvió en 10 μ l de una mezcla 3/7 (v/v) de acetonitrilo y TFA acuoso al 2%. Los péptidos individuales, purificados por RP-HPLC, se sometieron a un análisis adicional mediante registro de los espectros después de la extinción de la fuente (del inglés Post-Source-Decay).

1.4 Búsqueda en un banco de datos

La búsqueda en un banco de datos mediando utilización de las masas peptídicas proteolíticas se llevó a cabo con el programa Peptid Search Programm desarrollado en el grupo EMBL Protein & Peptide Group (<http://www.mann.embl-heidelberg.de> o <http://www.peptsearch.protana.com>). El PeptidSearch utiliza un banco de datos de proteínas no redundante, que contiene actualmente más que 465.000 inscripciones. La identificación de las proteínas está basada en la comparación del conjunto de masas peptídicas, que se dedujeron experimentalmente de las proteínas aisladas, con las masas teóricas deducidas enzimáticamente de los péptidos obtenidos enzimáticamente de todas las secuencias de proteínas en el banco de datos.

2. Resultados

2.1 Marcador de inflamación

Los criterios de selección para cuartas partes inflamadas subclínicamente de glándulas lácteas eran actividades de LDH de más que 2 μ mol/sI, cómputos de células somáticas mayores que 250.000 ml^{-1} y, en caso de que se hubieran determinado, resultados bacteriológicos positivos. Con finalidades de comparación se utilizaron sólo cuartas partes modificadas y no modificadas de la misma ubre. Las cuartas partes de ubres examinadas de las vacas escogidas se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Vacas individuales con cuartas partes de glándulas lácteas, inflamadas (1) y no modificadas (2)

Vaca	Cuarta parte	Unidades de LDH $\mu\text{mol/s I}$	SCC	Microbiología
1	1	12,23	9.911.000	n.d.
	2	1,21	30.000	
2	1	19,19	5.784.000	n.d.
	2	4,22	203.000	
3	1	16,50	5.010.000	n.d.
	2	1,67	29.000	

TABLA 1 (continuación)

	Vaca	Cuarta parte	Unidades de LDH $\mu\text{mol/s I}$	SCC	Microbiología
5					
	4	1	2,53	984.000	<i>Streptococcus spp.</i>
10		2	1,06	29.000	
	5	1	17,42	4.048.000	<i>Staphylococcus spp.</i>
15		2	1,58	162.000	
	6	1	28,11	7.697.000	<i>Streptococcus spp.</i>
20		2	2,86	50.000	
	7	1	5,21	1.436.000	<i>Staphylococcus spp.</i>
25		2	0,99	71.000	
	n.d.: no determinada				

2.2 Visualización por SDS-2D-PAGE de las fracciones de suero lácteo

La diferencia más manifiesta en los modelos obtenidos en 2D-PAGE es la aparición de 4 manchas en las fracciones de suero lácteo, que se habían obtenido a partir de cuartas partes inflamadas, comparadas con las que se obtuvieron de los respectivos testigos internos. Estas manchas están situadas en un peso molecular de 26 kDa a lo largo de un intervalo de pI (puntos isoeléctricos) de 5,2 hasta 6,2 y en la Figura 1 están marcadas con los números 1-4.

2.3 Identificación de las proteínas situadas dentro de las manchas

Las manchas 1-4, que se recortaron a partir de los geles de 2D, proporcionan unos modelos, por cromatografía así como por espectrometría de masas, de composiciones de péptidos cortados con quimiotripsina (los modelos de composiciones que se obtuvieron para las manchas 2 y 3 se muestran en las Figuras 2 y 3). Una búsqueda en el banco de datos, basándose en las masas de péptidos que se comprobaron, hizo posible identificar las proteínas inequívocamente como prostaglandina D sintasa del tipo de lipocalina (número de acceso 002853). Además, los datos de espectrometría de masas permitieron comprobar que la proteína madura comienza en el resto 39 de la secuencia del banco de datos.

Al comparar los modelos de composición de péptidos, que se obtuvieron a partir de las manchas 2 y 3, se pueden detectar dos diferencias, tal como se señala por medio de las flechas en la Figura 2 y en la Figura 3. Para la mancha 3 los correspondientes péptidos se pueden asignar a los segmentos de secuencia LLRPAGPPGICY y LRPAGPPGICY (véase la Figura 4). Los correspondientes péptidos de la mancha 2 muestran una diferencia de masas de -9 Da. Los espectros después de la extinción de la fuente (del inglés Post-Source-Decay-Spectra) de los dos péptidos aislados mediante una RP-HPLC hicieron posible asignar la modificación a un resto de cisteína en la posición 76 de la proteína madura. La diferencia de masas de -9 Da corresponde a la diferencia entre una cisteína alquilada con yodoacetamida y una cisteína oxidada para dar ácido sulfónico. Esto coincide también con la observación de que el punto isoeléctrico de la proteína modificada está desplazado hacia un valor ácido. La modificación mediante yodoacetamida (mancha nº 3) aparece durante las condiciones de electroforesis en gel en la segunda etapa de equilibrado, mientras que, por el contrario, la cisteína oxidada (mancha 2) ya se presenta, antes de la electroforesis bidimensional en gel, como un derivado de ácido sulfónico. Puesto que la introducción de un grupo de ácido sulfónico tiene una fuerte influencia sobre el punto isoeléctrico de una proteína, las diferentes cisteínas oxidadas pueden explicar la observación de varias manchas en el gel con pesos moleculares muy parecidos pero con valores de pI muy diferentes. Las diferentes manchas pueden ser provocadas también, no obstante, por una modificación después de la traducción, tal como ilustrativamente un modelo heterogéneo de glicosilaciones.

Ejemplo 2

Transferencia de borrón Western

Se llevaron a cabo transferencias de borrones Western de secreciones de leche procedentes de cuartas partes de ubres, que han sido modificadas diferentemente. Los anticuerpos policlonales, utilizados para la transferencia de borrón, fueron producidos contra la prostaglandina D sintasa procedente de un esperma de vaca.

ES 2 268 030 T3

Para la comparación se hizo uso de respectivos pares procedentes de la misma vaca. En el caso de las glándulas lácteas enfermas se puede reconocer una manifiesta coloración en la correspondiente posición, a la que se había aplicado el anticuerpo monoclonal. En el caso de la vaca 1, la cuarta parte “sana” estaba asimismo en vías de sufrir una inflamación, lo que muestra que con el procedimiento conforme al invento ya se pueden reconocer en un estadio muy temprano inflamaciones de las glándulas lácteas. A fin de obtener una discriminación segura entre resultados positivos (es decir glándulas inflamadas) y negativos (es decir glándulas sanas), se puede establecer un valor de corte o/y se pueden medir simultáneamente muestras de referencia.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la detección de una inflamación,

caracterizado porque

se determinan cualitativa y/o cuantitativamente la enzima prostaglandina D sintasa (PGDS) o fragmentos parciales de la misma, y porque en el caso de la inflamación que se ha de detectar se trata de una inflamación de las glándulas lácteas.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1,

para la detección de procesos inflamatorios en seres humanos o animales.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2

para la detección de inflamaciones de las glándulas lácteas de vacas.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3,

caracterizado porque

se determinan la enzima prostaglandina D sintasa (PGDS) o fragmentos parciales de la misma en una muestra de un líquido corporal, en una muestra de heces o en una muestra de leche.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4,

caracterizado porque

la muestra de un líquido corporal se escoge entre un plasma y una orina.

6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores,

caracterizado porque

la determinación se lleva a cabo mediando utilización de por lo menos un aptámero o/y un anticuerpo dirigido contra la prostaglandina D sintasa.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6,

caracterizado porque

se utiliza un anticuerpo policlonal o/y monoclonal.

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7,

caracterizado porque

se utiliza un anticuerpo, que se puede obtener mediando utilización de por lo menos uno de los péptidos PGDS1, PGDS2 o/y PGDS3.

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque

la determinación se lleva a cabo por medio de un inmunoensayo, en particular un ELISA en emparejado cuantitativo o una transferencia de borrón Western.

10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores,

caracterizado porque

la detección se efectúa con ayuda de una espectroscopia de masas, en particular una MALDI-TOF, o mediante una electroforesis en gel, en particular una electroforesis bidimensional en gel.

11. Utilización de un aptámero o de un anticuerpo dirigido contra la prostaglandina D sintasa (PGDS) para la preparación de un agente destinado a la detección de inflamaciones de las glándulas lácteas.

Fig. 1

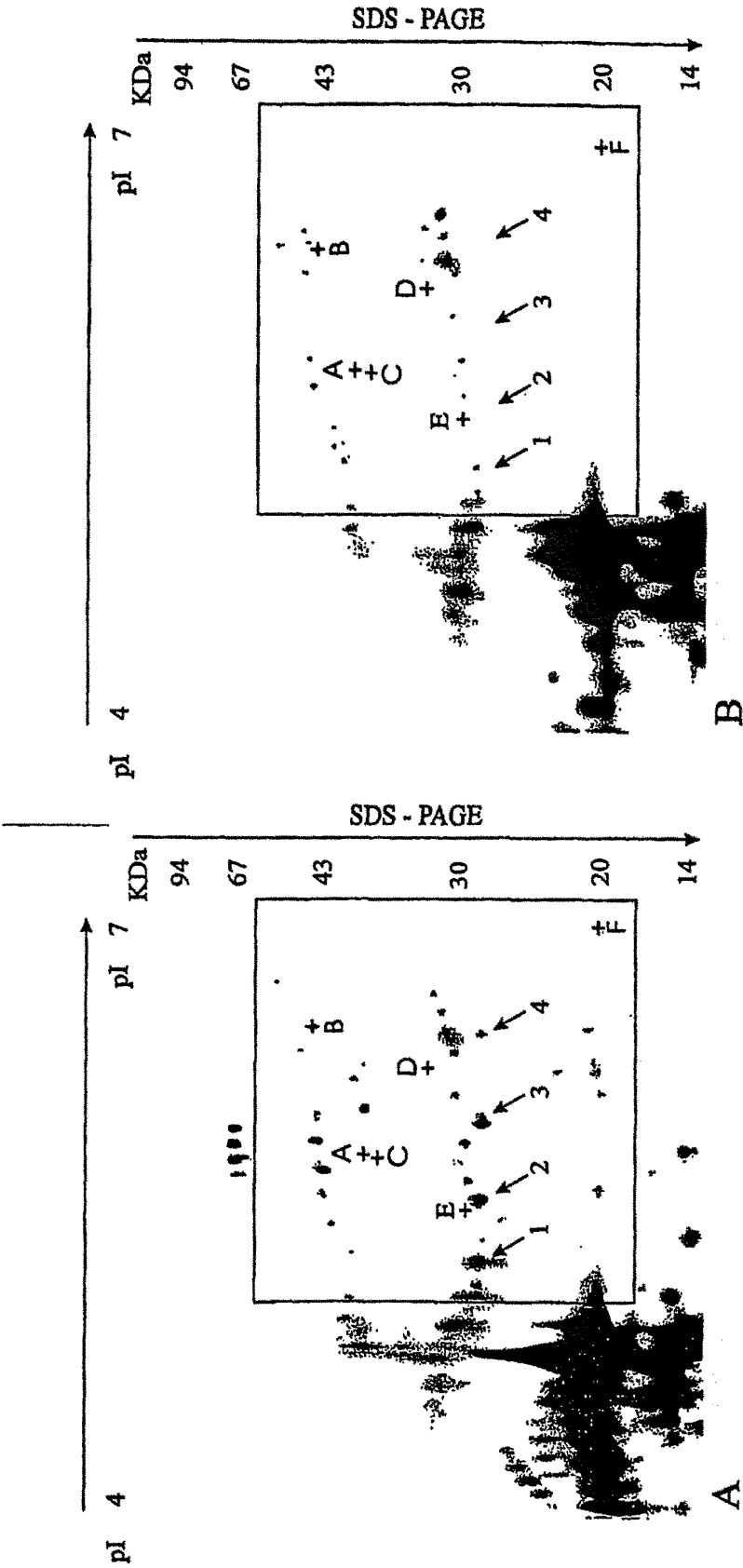
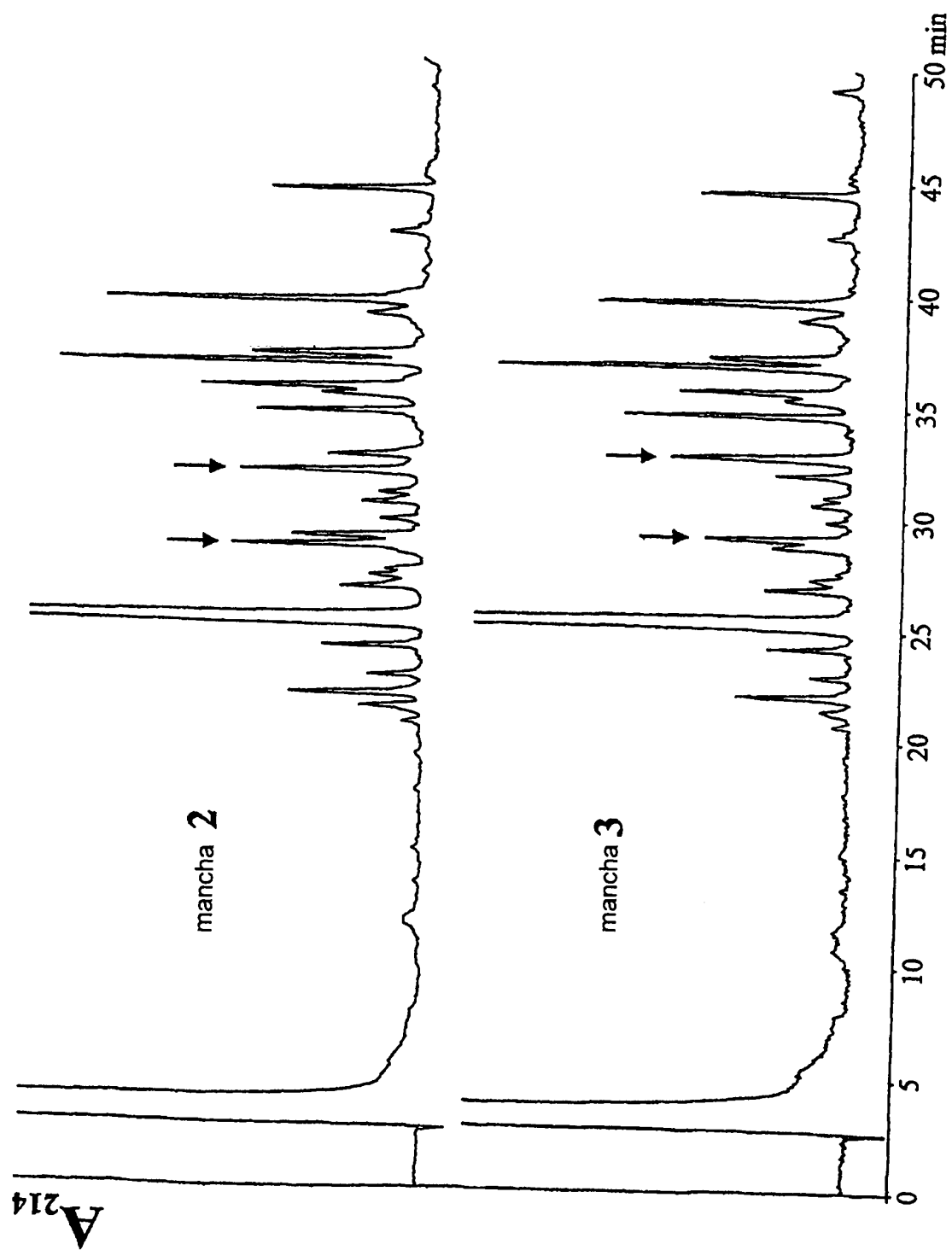


Fig. 2



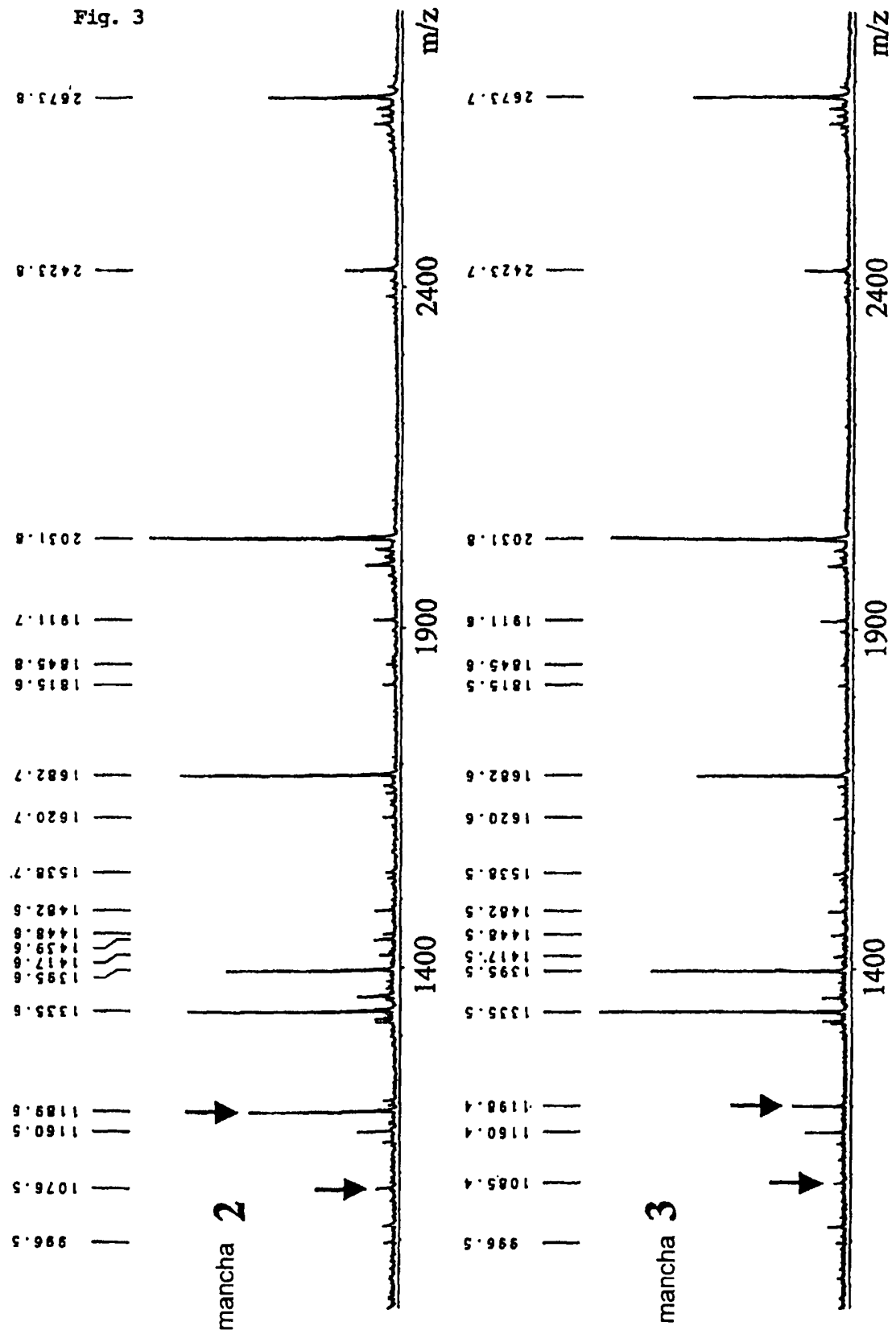


Fig. 4

ALQPNFEEDK FLGRWFTSGL ASNSSWFLEK

KKVLSMCKSV VAPAADGGLN LTSTFLRKDQ

CETRTLLRP ^{*}AGPPGCYSY SPHWSSTHEV

SVAETDYETY ALLYTEGVRG PGQDFRMTL

YSRSQNPRAE VKEHFTTFAK SLGFTTEGIV

FLPKTDKCME EHP

Transferencia de borrón Western de proteínas de suero lácteo

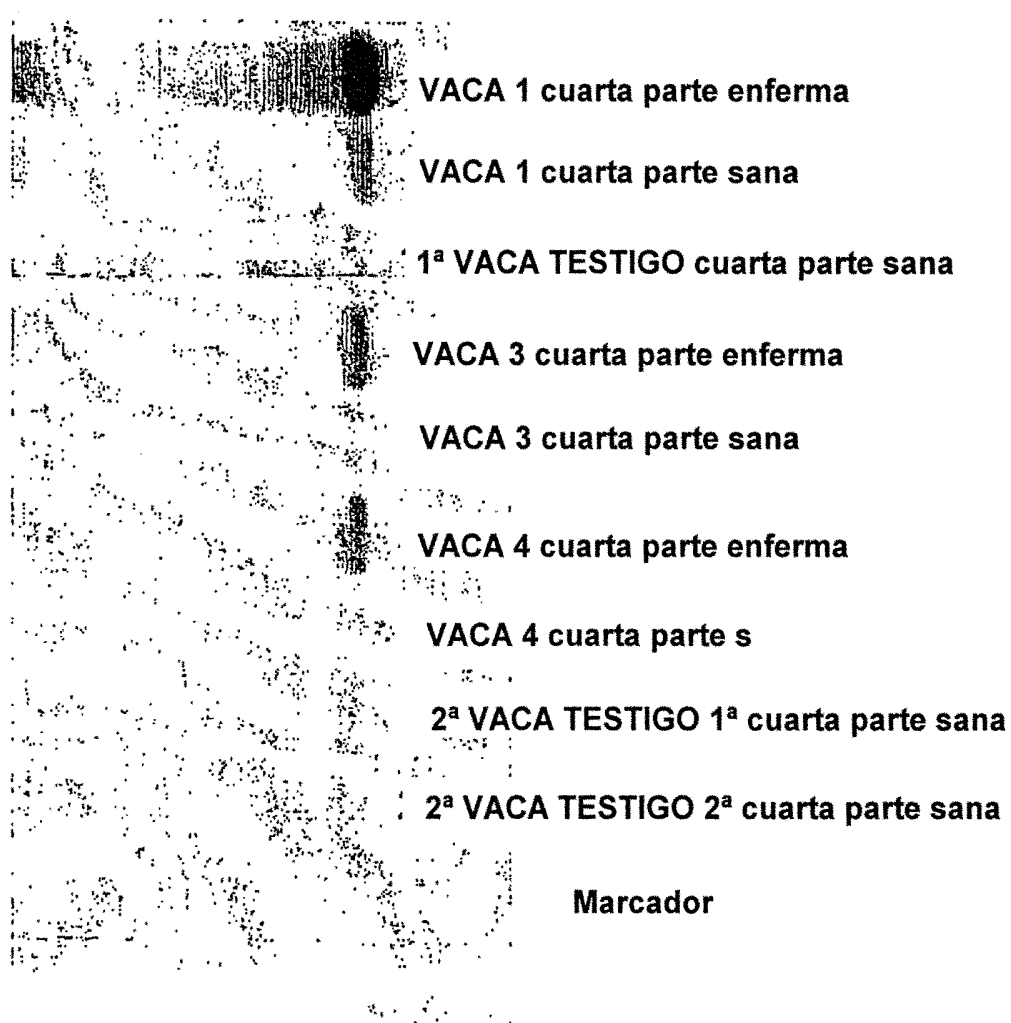


Figura 5