



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 625**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03722485 .4**

96 Fecha de presentación : **15.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1493034**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54

Título: **Procedimiento para la diagnosis de enfermedades inflamatorias e infecciones mediante la determinación de la inmunorreactividad de LASP-1.**

30

Prioridad: **19.04.2002 EP 02008840**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2011

73

Titular/es: **B.R.A.H.M.S GmbH**
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

72

Inventor/es: **Bergmann, Andreas;**
Fischer-Schulz, Christina y
Struck, Joachim

74

Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 356 625 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

5 **[0001]** La presente invención se refiere a nuevos usos de la proteína LASP-1, así como dado el caso de proteínas estrechamente emparentadas con la misma y que presenten al menos con respecto a sus primeros 200 aminoácidos la misma secuencia como la LASP-1 y con ello una inmunorreactividad equiparable, así como de fragmentos de las mismas, para la diagnosis médica de sepsis y de infecciones sistémicas análogas a la sepsis, así como de infartos de miocardio y de la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 1. La invención se basa en la determinación que primeramente se hizo de concentraciones muy incrementadas de la proteína LASP-1 en el tejido cerebral de primates a los que se les produjo experimentalmente mediante administración de toxinas una sepsis o una inflamación sistémica, así como en la subsiguiente determinación de una inmunorreactividad de LASP-1 muy incrementada en la circulación de pacientes con sepsis y de pacientes de Alzheimer, habiéndose constatado una correspondiente inmunorreactividad incrementada también en pacientes con infarto de miocardio.

10 **[0002]** Cuando en la siguiente descripción se habla de LASP-1, se entiende que este concepto no tan sólo designa a la conocida proteína LASP-1 con la concreta secuencia de aminoácidos que se indica en la ID SEC N°: 1, sino dado el caso también a las proteínas emparentadas con la misma y que dentro de los primeros 200 aminoácidos son secuencialmente idénticas a esta LASP-1, como es el caso p. ej. de la proteína LAP-1, con respecto a la cual se dan además explicaciones aclaratorias al final de la parte experimental de esta solicitud. Esta definición es válida para todas las referencias que se hagan a la LASP-1, a no ser que del contexto concreto se derive otra cosa para el experto en la materia. Cuando se habla de LASP-1, este concepto significa además también fragmentos con una inmunorreactividad de LASP-1, pudiendo todos los productos mencionados estar presentes tanto en forma libre como también dado el caso unidos a proteínas de unión y/o en una forma postranslacional modificada, o sea p. ej. en forma glicosilada y/o fosforilada.

[0003] La presente invención tiene su origen en intensivos trabajos de investigación de la solicitante en relación con adicionales perfeccionamientos de la diagnosis y terapia de inflamaciones e infecciones.

25 **[0004]** Se designan como inflamaciones con carácter totalmente general determinadas reacciones fisiológicas de un organismo a distintos impactos externos tales como p. ej. traumatismos, quemaduras, alergenos o infecciones por microorganismos tales como bacterias y hongos y virus, a tejidos foráneos que provocan reacciones de rechazo, o a determinados estados endógenos del cuerpo que provocan inflamaciones, como sucede p. ej. en el caso de las enfermedades autoinmunes y del cáncer. Las inflamaciones pueden surgir como reacciones inocuas y localmente limitadas del cuerpo, si bien son también características típicas de numerosas y severas afecciones crónicas y agudas de distintos tejidos, órganos y partes de órganos y tejidos.

30 **[0005]** Las inflamaciones locales son con ello en la mayoría de los casos parte de la reacción inmune sana del cuerpo a impactos dañinos, y son con ello parte del mecanismo de defensa del organismo para el mantenimiento de la vida. Cuando las inflamaciones son sin embargo parte de una reacción mal encaminada del cuerpo a determinados procesos endógenos, como sucede p. ej. en el caso de las enfermedades autoinmunes, y/o cuando dichas inflamaciones son de naturaleza crónica, o bien cuando las mismas alcanzan proporciones sistémicas, como sucede en el caso del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) o bien en el caso de una sepsis severa debida a causas infecciosas, los procesos fisiológicos típicos de las reacciones inflamatorias quedan fuera de control y se convierten en un verdadero suceso de enfermedad que a menudo constituye una amenaza para la vida. En el contexto de la presente solicitud de patente se considera también como enfermedad que va acompañada de síntomas típicos de una inflamación, concretamente del cerebro, a la enfermedad de Alzheimer, que está caracterizada por una inconteniblemente progresiva atrofia de la corteza cerebral que por regla general surge en el periodo que va de la 5ª a la 6ª década de vida, y que debido a su frecuencia reviste una gran importancia económica.

35 **[0006]** Hoy en día es sabido que la aparición y la evolución de procesos inflamatorios son controladas por un considerable número de sustancias que son preponderantemente de naturaleza proteínica o peptídica, y van acompañadas de una aparición más o menos limitada en el tiempo de determinadas biomoléculas. Pertenecen a las sustancias endógenas que participan en reacciones inflamatorias en particular las que pueden contarse entre las citoquinas, los mediadores, las sustancias vasoactivas, las proteínas de fase aguda y/o los reguladores hormonales. La reacción inflamatoria constituye una compleja reacción fisiológica en la que participan tanto sustancias endógenas activadoras de la aparición de la inflamación (como p. ej. TNF- α , interleuquina-1) como sustancias desactivadoras (como p. ej. interleuquina-10).

40 **[0007]** En las inflamaciones sistémicas como en el caso de una sepsis o del shock séptico las cascadas de reacción inflamatorio-específicas se extienden de manera incontrolada a todo el cuerpo y pasan con ello a constituir una amenaza para la vida, en el sentido de una excesiva respuesta inmune. Con respecto a los conocimientos actuales sobre la aparición y el posible papel que desempeñan distintos grupos de sustancias endógenas inflamatorio-específicas 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 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 en los últimos años han variado la comprensión de la sepsis y de las afecciones inflamatorias sistémicas emparentadas con la misma, y con ello también las definiciones reconocidas, 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 moderna definición del concepto de sepsis. En el marco de la presente solicitud los conceptos de sepsis y de afecciones (o enfermedades) inflamatorias se usan conforme a las definiciones que pueden extraerse de las tres referencias de la literatura anteriormente mencionadas.

5 **[0008]** Mientras que al menos en el ámbito europeo la infección bacteriana sistémica demostrable mediante un hemocultivo positivo ha acuñado durante largo tiempo el concepto de la sepsis, la sepsis se entiende hoy en día en primera línea como inflamación sistémica que tiene causas infecciosas pero que como suceso de enfermedad presenta grandes similitudes con las inflamaciones sistémicas que son provocadas por otras causas. Corresponden a la mencionada variación de la comprensión de la sepsis las variaciones de los planteamientos diagnósticos. Así, la determinación directa de agentes causales bacterianos ha sido sustituida o completada por complejas supervisiones de parámetros fisiológicos y más recientemente en particular también por la determinación de determinadas sustancias endógenas que participan en la aparición de la sepsis o en la aparición de la inflamación, es decir, de "biomarcadores" específicos.

10 **[0009]** De la gran cantidad de mediadores y proteínas de fase aguda de los que se sabe o se presume que participan en un suceso inflamatorio, son con ello adecuados a efectos diagnósticos en particular aquéllos cuya aparición es muy específica de afecciones inflamatorias o de determinadas fases o expresiones de afecciones inflamatorias, cuyas concentraciones varían drásticamente y de manera significativa para el diagnóstico, y que además presentan las estabildades necesarias para las determinaciones rutinarias y alcanzan altos valores de concentración. A efectos diagnósticos está con ello en primer plano la fiable correlación de los sucesos de enfermedad (inflamación, sepsis) con el respectivo biomarcador (buena especificidad y selectividad), sin que tenga que ser conocido el papel que éste desempeña en la compleja cascada de las sustancias endógenas que participan en el suceso inflamatorio.

15 **[0010]** Una sustancia endógena que es particularmente adecuada como biomarcador de sepsis es la procalcitonina. La procalcitonina es una prohormona cuyas concentraciones en suero alcanzan valores muy altos bajo las condiciones de una inflamación sistémica de etiología infecciosa (sepsis), mientras que en los sujetos sanos prácticamente no es determinable. En un estadio relativamente temprano de una sepsis se alcanzan además altos valores de procalcitonina, de manera que la determinación de procalcitonina es también adecuada para la detección precoz de una sepsis y para establecer anticipadamente la distinción entre una sepsis de etiología infecciosa e inflamaciones severas que tienen su origen en 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, EP 0 656 121 B1 y US 5.639.617. Para completar la presente descripción se hace explícitamente referencia a las susodichas patentes y a las anteriores referencias de la literatura indicadas en la publicación mencionada. En los últimos años ha aumentado considerablemente el número de publicaciones sobre el tema de la procalcitonina. Como representativas de las publicaciones resumidas de fechas anteriores se hace por consiguiente además referencia a W. Karzai et al., "Procalcitonin – A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection", Infection, Vol. 25, 1997, 329-334; y a M. Oczenski et al., "Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period", European Journal of Anesthesiology 1998, 15, 202-209; así como además a H. Redl et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol. 28, N° 11, 3659-3663; y a H. Redl et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", en: Sepsis 1998; 2:243-253; y a las adicionales referencias de la literatura que ahí se citan.

20 **[0011]** La disponibilidad del marcador de sepsis procalcitonina ha dado fuertes impulsos a la investigación de la sepsis, y actualmente se hacen intensivos esfuerzos para encontrar adicionales biomarcadores que puedan venir a complementar la determinación de procalcitonina y/o puedan proporcionar adicionales informaciones a efectos de diagnóstico de precisión y de diagnóstico diferencial. 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 exacta función y sobre los exactos motivos para la aparición de determinadas sustancias endógenas que participan en el suceso inflamatorio o infeccioso.

25 **[0012]** Los resultados de la comprobación experimental de un fructífero enfoque puramente hipotético para la determinación de adicionales potenciales marcadores de sepsis se encuentran en la DE 198 47 690 A1 o WO 00/22439. Ahí se indica que en caso de sepsis no tan sólo está incrementada la concentración de la prohormona procalcitonina, sino que pueden observarse concentraciones significativamente incrementadas también para otras sustancias peptídicas que presentan inmunoreactividad prohormonal. Mientras que el fenómeno descrito está bien documentado, siguen estando en gran parte sin aclarar las causas del aumento de la inmunoreactividad prohormonal en la sepsis.

30 **[0013]** En la presente solicitud se exponen resultados de otro enfoque puramente experimental para la búsqueda de adicionales biomoléculas inflamatorio- y sepsis-específicas. También estas investigaciones experimentales toman su salida en la determinación de procalcitonina en relación con reacciones inflamatorias sistémicas de etiología infecciosa. Así, muy pronto se observó que en la sepsis la procalcitonina evidentemente no se forma de la misma manera como cuando es precursor de la hormona calcitonina. Así, se observaron altos niveles de procalcitonina también en pacientes a los que se les había extirpado la tiroides. Por consiguiente, la tiroides no puede ser el órgano en el que en caso de sepsis se forma o se libera procalcitonina. En las publicaciones H. Redl et al., "Procalcitonin

release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin”, Crit Care Med 2000, Vol. 28, Nº 11, 3659-3663; y H. Redl et al., “Non-Human Primate Models of Sepsis”, Sepsis 1998; 2:243-253, se exponen los resultados de investigaciones experimentales que supuestamente servían para la aclaración de la formación de procalcitonina en caso de sepsis. En los trabajos mencionados se les produce mediante administración de endotoxinas a primates (babuinos) una sepsis artificial, y se determina en qué estados producidos experimentalmente se alcanzan en la sangre las más altas concentraciones de procalcitonina. Un perfeccionamiento del modelo animal de ensayo que se describe en los trabajos mencionados sirve dentro del marco de la presente solicitud para determinar nuevos biomarcadores inflamatorio- y/o sepsis-específicos endógenos de naturaleza peptídica o proteínica cuya aparición es característica de determinadas formas de inflamaciones y/o sepsis y que por consiguiente posibilitan una específica o dado el caso órgano-específica diagnosis de sepsis o inflamación. El modelo primate fue además elegido sobre la base de la grandísima similitud de fisiología de los primates y los humanos y de la alta reactividad cruzada con muchos reactivos terapéuticos y diagnósticos humanos.

[0014] Puesto que las sustancias endógenas que se forman en las inflamaciones son parte de la compleja cascada de reacciones del cuerpo, tales sustancias son además no tan sólo de interés diagnóstico, sino que actualmente también se intenta con considerable esfuerzo intervenir terapéuticamente en el suceso inflamatorio influenciando la aparición y/o la concentración de distintas sustancias de este tipo, para detener con la máxima anticipación la propagación sistémica de la inflamación que se observa por ejemplo en caso de sepsis. En este sentido deben considerarse también como potenciales dianas terapéuticas las sustancias endógenas que demostrablemente intervienen en el suceso inflamatorio. Intentos de influenciar positivamente en un contexto terapéutico el suceso inflamatorio incidiendo en determinados mediadores del mismo están descritos por ejemplo en E.A. Panacek, “Anti-TNF strategies”, Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung; Nº 2, 2001, 4-5; T. Calandra et al., “Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor”, Nature Medicine, Vol. 6, Nº 2, 2000, 164-170; o K. Garber, “Protein C may be sepsis solution”, Nature Biotechnology, Vol. 18, 2000, 917-918. En vista de los planteamientos terapéuticos más bien decepcionantes que se han hecho hasta la fecha, hay gran interés en identificar adicionales biomoléculas endógenas en lo posible inflamatorio- y sepsis-específicas que también como dianas terapéuticas abran nuevas probabilidades de éxito para la lucha contra las inflamaciones.

[0015] La presente invención se basa en que en los primates y los humanos en caso de sepsis es detectable en una forma soluble en el tejido cerebral citoplasmático la proteína LASP-1 altamente sobreexpresada, o una proteína idéntica a la misma dentro de los primeros 200 aminoácidos, y ello concretamente a diferencia de los sujetos sanos o no tratados, en los que no se encuentra o bien se encuentra tan sólo en concentraciones cercanas al límite de determinación analítica, y también a diferencia de otros tejidos corporales de los animales de ensayo primates sépticos, lo cual hace que esta proteína parezca adecuada para la diagnosis de inflamaciones y la diagnosis de infecciones y de sepsis con afectación cerebral.

[0016] La invención se basa además en que se constató que también en la circulación de pacientes de sepsis humanos, pero también de pacientes de Alzheimer, es mensurable una claramente incrementada inmunorreactividad de LASP-1, lo cual respalda o incrementa considerablemente el valor de los conocimientos adquiridos sobre la base de los extractos cerebrales de primates.

[0017] Se describen más detalladamente a continuación los usos en la diagnosis, que se dan sobre la base de la por primera vez demostrada aparición cerebro-específica de LASP-1 en la simulación experimental de sepsis, así como a partir de la determinación de una claramente incrementada inmunorreactividad de LASP-1 en las muestras de suero o plasma.

[0018] Las reivindicaciones 1 a 11 definen más detalladamente los nuevos procedimientos resultantes según la presente invención, y preferidas formas de realización de los mismos.

[0019] Como se expondrá más detalladamente a continuación en la parte experimental, fue punto de partida de la invención la constatación de que tras haber sido provocada experimentalmente una sepsis artificial en babuinos mediante administración de endotoxina (LPS de Salmonella Typhimurium) y tras el retratamiento por electroforesis en gel en 2 dimensiones de tejido cerebral de los animales tratados fue hallada como uno de los productos que son identificables tan sólo en los animales tratados una proteína que era en gran parte, y concretamente al menos dentro del segmento de los aminoácidos 1 a 200, idéntica a la conocida proteína LASP-1, habiéndose además observado la proteína en una concentración considerablemente incrementada tan sólo en el tejido cerebral. Para su identificación se aisló del gel de electroforesis una nueva mancha de proteína que fue hallada tan sólo en el tejido cerebral de los animales tratados y según electroforesis en gel presentaba un peso molecular de aproximadamente 36 ± 3 kDa y un punto isoeléctrico de aproximadamente 6,6-7,0, y dicha mancha de proteína se descompuso mediante digestión con tripsina en fragmentos que fueron analizados por espectrometría de masas de manera en sí conocida. Mediante comparación con el conocido espectro de masas de la proteína LASP-1 tratada con tripsina la proteína de la mancha aislada fue identificada como una que al menos dentro de amplios segmentos era idéntica a la proteína LASP-1.

[0020] Se describirá más detalladamente en la parte experimental la identificación del producto hallado en la mancha de proteína, debiendo según los reconocidos principios interpretativos considerarse la identificación descrita como una segura identificación de un producto con una secuencia de aminoácidos de la proteína LASP-1.

[0021] El peso molecular determinado analíticamente de la cadena peptídica de LASP-1 (véase la ID SEC Nº: 1; 261

aminoácidos) es de 29.717 daltons. La LASP-1 se halla sin embargo fisiológicamente en forma procesada postranslacional (glicosilada y fosforilada). Así, el producto posteriormente caracterizado como LASP-1 fue identificado originalmente como una fosfoproteína ("pp40") cAMP-dependiente de 40 kDa en células de la pared estomacal (véanse C.S. Chew et al., *Journal of Cell Science* 113, 20035-2045 (2000); C.S. Chew et al., *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67, (1998)).

[0022] La secuencia de aminoácidos de la fosfoproteína caracterizada como LASP-1 fue determinada originalmente como la del putativo producto de expresión del cDNA de un gen "MLN 50" de la región q11-q21,3 del cromosoma 17 que como tal gen es sobreexpresado en líneas celulares de cáncer de mama humanas (C. Tomasetto et al., *FEBS Letters* 373 (1995): 245-249; C. Tomasetto et al., *Genomics* 28: 367-376 (1995); I. Bièche et al., *Cancer Res.* 56: 3886-3890 (1996)). El nombre LASP-1 viene de que en esta proteína por vez primera un dominio llamado dominio LIM (un dominio de unión a Zn conocido por distintas proteínas; véase A. Hammarström et al., *Biochemistry* 1996, 35, 12723-12732) está combinado con un dominio (SH3), conocido por la llamada src-cinasa receptor-independiente, que es una tirosina-cinasa (LIM and SH3 Protein); véase también Brian K. Kay et al., *FASEB J.* 14, 231-241 (2000).

[0023] El mRNA de LASP-1 es determinable ubicuamente en células normales (p. ej. próstata, hígado, músculo, cerebro, distintos tipos de células) y es sobreexpresado en una determinada proporción porcentual de casos de cáncer de mama. Se constató que la LASP-1 es una proteína de unión a actina para la que se supone que se cuenta entre las proteínas asociadas al citoesqueleto y es de importancia para la forma y movilidad de las células, así como posiblemente para la transmisión de señales. Esta proteína es también determinable en terminaciones nerviosas. La LASP-1 se solubiliza tan sólo difícilmente mediante detergentes. In vitro la LASP-1 ha demostrado ser un sustrato que puede fosforilarse preeminentemente con la PKA serina/treonina cinasa cAMP-dependiente. La LASP-1 presenta en distintos tipos de células epiteliales distintos patrones de expresión (véanse C.S. Chew et al., *Journal of Cell Science* 113, 2035-2045 (2000); C.S. Chew et al., *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67, (1998)).

[0024] La aparición de LASP-1 o de una proteína en gran parte coincidente con la misma en forma sobreexpresada en tejido cerebral en caso de sepsis es de gran interés científico, diagnóstico y posiblemente también terapéutico. El hecho de que la LASP-1 es un sustrato de cinasa y una fosfoproteína le confiere cierta similitud con las llamadas proteínas tau, que en la enfermedad de Alzheimer desempeñan un papel en particular a efectos diagnósticos (véanse p. ej. G. A. Jicha et al., *Journal of Neurochemistry*, 69, 2087-2095 (1997) y la literatura que ahí se cita; así como los documentos EP 673 418, EP 737 208, EP 772 634, EP 610 330 y EP 618 968).

[0025] Es ahora bien sabido que la enfermedad de Alzheimer puede ser considerada como un proceso inflamatorio específico del cerebro, sin que con ello deba establecerse un diagnóstico con respecto a la causa de la enfermedad o a la consecuencia de la enfermedad (Lih-Fen Lue et al., *GLIA* 35: 72-79, 2001; Michael Hüll et al., *DDT Vol. 4, N° 6: 275-282; (June 1999); F. Licastro et al., Journal of Neuroimmunologie* 103 (2000), 97-102; Neuroinflammation Working Group: Haruhiko Akiyama et al., *Neurobiology of Aging* 21 (2000) 383-421; Michael Hüll et al., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (2000) 9 (4): 671-683; M. Hüll et al., *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (1996) 246:124-128; J. Rhodin et al., *Annals New York Academy of Sciences*, 199x, 345-352). El hecho de que la fosfoproteína LASP-1 o una proteína coincidente con la misma dentro de los primeros 200 aminoácidos es determinable en forma sobreexpresada específicamente para el cerebro bajo condiciones experimentales que simulan una sepsis o un suceso inflamatorio sistémico análogo a la sepsis hizo que fuese muy probable que también en la enfermedad de Alzheimer sea observable una sobreexpresión de LASP-1 o una determinada forma de expresión de LASP-1, y que la determinación de LASP-1 alcance por consiguiente importancia también para la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer. Las determinaciones inmunodiagnósticas que a continuación se efectuaron de una inmunorreactividad en sueros de pacientes de sepsis y de Alzheimer que podía adjudicarse a la secuencia de los primeros 200 aminoácidos de LASP-1, confirmaron experimentalmente esta presunción de manera contundente y convincente.

[0026] La solicitud de patente internacional WO 0185986 describe un procedimiento para la identificación de moduladores de la unión de LASP-1 a una de las subunidades de una isoforma de la fosfatidilinositol-3-cinasa (P13K δ), que es principalmente expresada en leucocitos. Con estos moduladores se impide supuestamente una lesión debido a excesivas reacciones inflamatorias (entre otras, la sepsis).

[0027] Sobre la base de los hallazgos accesibles hasta la fecha no era de esperar que las concentraciones fisiológicas de LASP-1 en una muestra de suero o plasma como consecuencia de una sepsis y/o una inflamación específica del cerebro tal como el Alzheimer estuviesen modificadas de modo significativo y demostrable, y que por consiguiente pudiese ser diagnósticamente de interés una determinación de la concentración de LASP-1 en tales muestras dentro del marco de un suceso de sepsis o de una afección cerebral inflamatoria.

[0028] La determinación según la invención de comparativamente altas concentraciones de LASP-1 en el tejido cerebral de primates a los que se les provocó una sepsis artificial mediante administración de toxina, con la simultánea imposibilidad de identificar LASP-1 en muestras de animales de control tratadas por lo demás de forma totalmente igual, o en otras muestras tisulares de los animales sépticos, y la subsiguiente determinación inmunodiagnóstica en muestras de suero o plasma de pacientes humanos, es altamente significativa. Puesto que la aparición era observable tan sólo en los animales tratados, y en concreto ya relativamente poco tiempo después de haber sido provocada la sepsis mediante administración de toxinas, es posible utilizar este hecho para lograr un procedimiento diagnóstico muy prometedor para la diagnosis de sepsis o de infecciones sistémicas similares a la

sepsis mediante la determinación de la inmunorreactividad de LASP-1. Es además particularmente de interés la demostrada idoneidad de la LASP-1 como marcador diagnóstico y marcador de prognosis para la enfermedad de Alzheimer.

5 **[0029]** La determinación de LASP-1 puede además efectuarse según cualquier procedimiento de determinación adecuado, pareciendo sin embargo desde un punto de vista práctico la más ventajosa la determinación en una muestra de suero o plasma de un paciente por vía inmunodiagnóstica (mediante un inmunoensayo) usando adecuados anticuerpos selectivos.

10 **[0030]** Sobre la base del hecho de que en el cerebro de primates al haber sido provocada experimentalmente una sepsis, así como a continuación también en una muestra de suero o de plasma de pacientes humanos pudo determinarse por primera vez una incrementada aparición de LASP-1 o de una proteína idéntica a la misma dentro de los primeros 200 aminoácidos, se logra con ello la posibilidad de utilizar la inmunorreactividad de LASP-1 en particular a efectos diagnósticos en relación con la sepsis y con infecciones sistémicas análogas a la sepsis, así como en relación con la enfermedad de Alzheimer y con infartos de miocardio. Para ello pueden producirse de manera selectiva ya sea sintéticamente o bien mediante tecnología genética LASP-1 o adecuados péptidos parciales de la misma o epítopes o combinaciones de epítopes dado el caso también según procedimientos que en el entretanto han pasado a formar parte del estado de la técnica. Péptidos parciales de LASP-1, dado el caso en forma marcada, pueden también ser necesarios como calibradores, indicadores y competidores para determinados formatos de ensayo para determinaciones inmunodiagnósticas, y pueden producirse para ello como se aclara. Se describen más detalladamente a continuación en la siguiente parte experimental determinadas formas de realización concretas actualmente preferidas.

20 **[0031]** Además pueden usarse fragmentos de LASP-1 o adecuadas secuencias parciales de los mismos según procedimientos conocidos del moderno estado de la técnica también para la producción de anticuerpos policlonales o bien también monoclonales específicos que sean adecuados como medios auxiliares para la determinación diagnóstica de LASP-1 en fluidos corporales de un paciente y/o también como potenciales medios terapéuticos. Se describen más detalladamente a continuación en la siguiente parte experimental determinados y concretos y actualmente preferidos anticuerpos anti-LASP-1 policlonales purificados por afinidad. La producción de anticuerpos monoclonales adecuados contra secuencias peptídicas parciales conocidas pertenece hoy en día al estado general de la técnica y no requiere ser descrita en particular. Además es también digna de ser explícitamente mencionada la producción de anticuerpos usando técnicas de inmunización genética directa con un correspondiente DNA. Queda con ello dentro del marco de la presente invención el usar para la inmunización p. ej. un cDNA de LASP-1 o fragmentos de LASP-1, puesto que en el pasado ha quedado de manifiesto que con la utilización de tales técnicas de inmunización puede ampliarse el espectro de los anticuerpos obtenibles. Pero también pueden usarse anticuerpos contra LASP-1 ya conocidos (véanse p. ej. V. Schreiber et al., *Molecular Medicine* 4: 675-687, 1998; C.S. Chew et al., *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67, (1998)).

35 **[0032]** Puesto que dentro del marco de los trabajos que aquí se describen fue hallado en el gel de la electroforesis en 2 dimensiones un producto de LASP-1 con una masa molar de aprox. 36 kDa, que presenta una solubilidad suficiente para la determinación que se describe, no podía excluirse que el producto de LASP-1 hallado presentase un producto de expresión distinto de la LASP-1 propiamente dicha que se describe en la literatura, como p. ej. el producto de un corte y empalme alternativo, y/o una determinada clase de glicosilación y/o fosforilación, que le confiere la solubilidad observada y sobre la base de la cual se diferencia de manera significativa del producto de 40 kDa aislado de la pared estomacal. Por consiguiente, desde el comienzo de las investigaciones se consideró que queda situado dentro del marco de la presente invención el efectuar la determinación de LASP-1 con ayuda de un ensayo específico en el que se identifiquen las específicas secuencias parciales y/o en el que se identifiquen también específicos patrones de glicosilación y/o fosforilación. La fabricación de anticuerpos, y en particular de anticuerpos monoclonales, que identifiquen específicas glicosilaciones y/o fosforilaciones es básicamente conocida y está descrita p. ej. en relación con la determinación de determinadas formas de fosforilación de las llamadas proteínas tau dentro del marco de la diagnosis del Alzheimer.

50 **[0033]** Para la determinación inmunológica de LASP-1 puede además procederse fundamentalmente como se describe p. ej. para la determinación selectiva de procalcitonina en P. P. Ghillani et al., "Monoclonal antipeptide antibodies as Tools to dissect closely related gene products", *The Journal of Immunology*, vol. 141, N° 9, 1988, 3156-3163; y P.P. Ghillani et al., "Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases", *Cancer research*, vol. 49, N° 23, 1989, 6845-6851. El experto en la materia puede sacar de las correspondientes obras estándar y publicaciones y utilizar convenientemente variaciones de las técnicas que se describen y/u otras técnicas de inmunización.

55 **[0034]** Sobre la base de los presentes resultados, la LASP-1 o dado el caso fragmentos de LASP-1 o productos de secuencia parcialmente idéntica tales como la LAP-1 pueden servir de inmunorreactividad o de específicos péptidos marcadores (biomarcadores) para la determinación diagnóstica y para el control de la evolución de sepsis, de infecciones sistémicas tipo sepsis, de infartos de miocardio y de inflamaciones del cerebro tales como la enfermedad de Alzheimer. Como la determinación de procalcitonina, la determinación de LASP-1 puede además hacerse para la detección precoz dentro del marco de una diagnosis diferencial y para la detección así como para el establecimiento de una prognosis de la evolución, para la valoración del grado de severidad y para la valoración de la evolución de

inflamaciones e infecciones como acompañamiento a la terapia, determinándose en un procedimiento de este tipo en una muestra de suero o plasma de un paciente el contenido de LASP-1 y sacándose de la presencia y/o cantidad de LASP-1 constatada conclusiones acerca de la existencia de una sepsis, de un infarto de miocardio o de la enfermedad de Alzheimer y correlacionándose el resultado obtenido con el grado de severidad de la sepsis, del infarto de miocardio o de la enfermedad de Alzheimer, y valorándose dado el caso las posibilidades de tratamiento y/o las perspectivas de tratamiento.

[0035] Parece particularmente interesante una determinación de LASP-1 dentro del marco de una determinación multiparamétrica en la que se determine al mismo tiempo al menos un adicional parámetro de inflamación o infección y en la que se obtenga un resultado de medición en forma de un conjunto de al menos dos magnitudes de medición, que se valorará para la diagnosis de precisión de la inflamación o infección. Deben considerarse como tales adicionales parámetros de inflamación o infección los seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de los parámetros que son en parte conocidos o están publicados en las anteriores y paralelas solicitudes de patente de la solicitante, cuyo grupo consta de procalcitonina, CA 125, CA 19-9, S100B, proteínas S100A, fragmentos de citoqueratina solubles, y en particular CYFRA 21, TPS y/o fragmentos de citoqueratina-1 solubles (sCY1F), los péptidos inflamina y CHP, prohormonas peptídicas, la glicina-N-aciltransferasa (GNAT), la carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS 1) y sus fragmentos y la proteína C-reactiva (CRP) o fragmentos de todas las proteínas mencionadas. Es ventajoso efectuar la determinación multiparamétrica como determinación simultánea mediante un dispositivo de medición con tecnología de chips o mediante un dispositivo de medición inmunocromatográfica, efectuándose en dicha determinación simultánea la evaluación del complejo resultado de medición obtenido con el dispositivo de medición con ayuda de un programa de ordenador.

[0036] En una forma de realización preferida el procedimiento se ejecuta como inmunoensayo en sándwich heterogéneo en el que uno de los anticuerpos 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 el otro anticuerpo lleva un resto 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 retardada en el tiempo o posterior usando adecuadas fases fijas.

[0037] Fundamentalmente pueden aplicarse todas las técnicas de marcación que son utilizables en ensayos de la clase que se describe, a las cuales pertenecen las marcaciones con radioisótopos, enzimas, etiquetas de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia y marcaciones de color detectables directa y ópticamente, como por ejemplo átomos de oro y partículas de colorante como las que se usan en particular para las llamadas pruebas de "Point-of-Care" (POC) o pruebas rápidas. Ambos anticuerpos pueden también presentar en el caso de los inmunoensayos heterogéneos en sándwich partes de un sistema de detección de la clase que se describe a continuación en relación con ensayos homogéneos.

[0038] Queda con ello dentro del marco de la presente invención el configurar el procedimiento según la invención también como prueba rápida.

[0039] Al procedimiento según la invención puede además dársele forma de procedimiento homogéneo en el que los complejos en sándwich formados a base de ambos anticuerpos y de la LASP-1 a determinar permanecen en suspensión en la fase líquida. En un caso así 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 de señal o activación de señal. Tales técnicas son perfeccionables en particular como procedimientos de detección por intensificación de fluorescencia o extinción de fluorescencia. Un particularmente preferido procedimiento de este tipo supone el uso de reactivos de detección que se usan por parejas, como son 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. Dichos reactivos de detección permiten una medición que detecta selectivamente tan sólo los productos de reacción que contienen ambos componentes de marcación en un único inmunocomplejo, directamente en la mezcla de reacción. Como ejemplo se hace referencia a la tecnología que se ofrece bajo las marcas TRACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) o KRYPTOR®, la cual lleva a la práctica las enseñanzas de las solicitudes anteriormente mencionadas.

[0040] Se describe más detalladamente a continuación la detección e identificación de LASP-1 y su determinación en fluidos biológicos (sueros y plasmas) de pacientes con distintas enfermedades. Las figuras muestran lo siguiente:

La Fig. 1, vistas de geles de electroforesis en 2 dimensiones que permiten una comparación de los patrones de manchas de las proteínas cerebrales citoplasmáticas de un babuino sano (A) con los de las proteínas cerebrales de un babuino 5 h después de una sepsis inducida mediante administración de LPS (LPS = lipopolisacáridos) (B). La flecha indica la posición del producto sepsis-específico según la invención (LASP-1), que en la representación (B) está destacado mediante un círculo;

la Fig. 2, el espectro de masas del producto digerido con tripsina aislado del gel de la electroforesis en gel en 2 dimensiones;

la Fig. 3, una representación comparativa de los resultados de la medición de la inmunorreactividad de LASP-1 (1-

200) usando inmunoensayos con distintas parejas de tres anticuerpos que fueron usados en forma unida a la fase fija y en forma marcada e identificaron las secuencias de aminoácidos 121-137, 147-159 y 170-187 de LASP-1. Puede apreciarse que con todas las parejas fueron obtenidos resultados en gran medida idénticos;

5 la Fig. 4, los resultados de una determinación inmunodiagnóstica de una inmunorreactividad de LASP-1 (1-200) en sueros de 294 personas de control sanas y 96 pacientes de sepsis;

la Fig. 5, los resultados de una determinación inmunodiagnóstica de una inmunorreactividad de LASP-1 (1-200) en sueros de 294 personas de control sanas y 80 pacientes de Alzheimer;

la Fig. 6, los resultados de una determinación inmunodiagnóstica de una inmunorreactividad de LASP-1 (1-200) en sueros de 294 personas de control sanas y de 20 pacientes de infarto de miocardio.

10 PARTE EXPERIMENTAL

1. Simulación de una infección mediante administración de endotoxinas en el modelo animal (babuinos).

15 [0041] Conforme a los ensayos efectuados con babuinos para la simulación de la liberación de procalcitonina mediante inyecciones de endotoxinas (véanse H. Redl et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol. 28, N° 11, 3659.3663; H. Redl et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", en: Sepsis 1998; 2:243-253), les fueron administrados por vía intravenosa a sendos babuinos (machos, de aprox. 2 años de edad y de un peso de 27 a 29 kg) respectivamente 100 µg de LPS (lipopolisacárido de Salmonella Typhimurium, casa proveedora: Sigma) por kg de peso corporal. De 5 a 5,5 h después de la inyección los animales fueron sacrificados mediante administración intravenosa de 10 ml de Doletal. Dentro de un periodo de tiempo de 60 min. después de su exitus se procedió a preparar todos los 20 órganos/tejidos y a estabilizarlos mediante congelación en nitrógeno líquido.

25 [0042] Para el adicional procesamiento, muestras de los distintos tejidos congelados (1 g) fueron mezcladas bajo enfriamiento con nitrógeno con 1,5 ml de tampón A (HCl/Tris 50mM, pH 7,1, KCl 100mM, 20% de glicerol) y pulverizadas en un mortero de porcelana hasta quedar en forma de una harina (véase J. Klose, "Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis", en: Methods in Molecular Biology, Vol. 112: 2-D Proteome Analysis Protocols, Humana Press Inc., Totwa, NJ). Tras una centrifugación efectuada a continuación durante 1 hora a 100.000 g y a +4°C, se extrajo el supernatante obtenido y se le puso en almacenamiento a -80°C hasta el adicional procesamiento.

2. Análisis proteómico usando proteínas cerebrales citoplasmáticas de babuinos.

30 [0043] Se usaron dentro del marco de un análisis proteómico extractos citoplasmáticos de proteínas de células cerebrales de por un lado babuinos sanos (control) y por otro lado babuinos a los que les había sido inyectado LPS. Para la electroforesis en gel en 2 dimensiones analítica inicial se ajustó extracto cerebral que contenía 100 µg de proteína a urea 9M, DTT (DTT = ditioneitol) 70mM, 2% de anfolito, pH 2-4, y se procedió luego a su separación mediante electroforesis en gel en 2 dimensiones analítica como está descrito en J. Klose, et al., "Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional análisis of the genome", 35 Electrophoresis 1995, 16, 1034-1059. La visibilización de las proteínas en el gel de electroforesis en 2 dimensiones se hizo mediante coloración con plata (véase J. Heukeshoven et al., "Improved silver staining procedure for Fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels", Electrophoresis 1988, 9, 28-32).

40 [0044] Para la evaluación los patrones de manchas de proteína de las muestras de animales tratados fueron comparados con los patrones de manchas de proteína que resultaron de muestras de tejido cerebral de animales no tratados. Los patrones de manchas de proteína del tejido cerebral de animales tratados fueron además también comparados con los de otros tejidos de los mismos animales tratados (los resultados no están ilustrados en detalle). Se seleccionaron para adicionales investigaciones analíticas sustancias que no aparecieron en ninguna muestra de control pero aparecieron adicionalmente en todos los animales tratados. La Fig. 1 muestra una comparación de los 45 geles de electroforesis en 2 dimensiones para una muestra de control (A) y una muestra de un animal tratado (B), correspondiendo la adicional mancha de proteína en (B) a una nueva proteína cuya posición ha sido destacada mediante una flecha y un círculo.

50 [0045] Las nuevas proteínas específicas identificadas en el patrón de manchas de proteína de la electroforesis en gel en 2 dimensiones analítica fueron entonces preparadas a continuación mediante electroforesis en gel en 2 dimensiones preparativa usando 350 µg de proteína (véase de nuevo (10)). En la electroforesis en gel en 2 dimensiones preparativa la coloración se hizo mediante Azul Brillante de Coomassie G250 (véase V. Neuhoff et al., "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, 9, 255-262).

55 [0046] Las manchas de proteína preseleccionadas para el adicional análisis fueron recortadas del gel, diluidas con tripsina aplicando el método que está descrito en A. Otto et al., "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", Electrophoresis 1996, 17, 1643-1650; y analizadas a continuación mediante espectroscopia de masas, concretamente aplicando las investigaciones de espectrometría de masas como las que se describen y discuten p.

ej. en G. Neubauer et al., "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex", en: nature genetics vol. 20, 1998, 46-50; J. Lingner et al., "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", en: Science, Vol. 276, 1997, 561-567; M. Mann et al., "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and proteina sequence databases", en: TRENDS in Biochemical Sciences, Vol. 26, 1, 2001, 54-61. Las muestras diluidas con tripsina fueron sometidas a una espectrometría de masas MALDI-TOF.

3. Identificación de LASP-1

[0047] Como se muestra en las Figuras 1(A) y 1(B), en extractos de tejido cerebral de babuinos a los que les hubo sido administrada una inyección de LPS se encuentra entre otras una mancha de una proteína para la que sobre la base de los datos de electroforesis en gel en comparación con sustancias marcadoras de peso molecular conocido fue estimado un peso molecular de aprox. 36 ± 3 kDa, mientras que a partir de la posición relativa de la proteína de la primera dimensión se determinó un punto isoeléctrico de aprox. 6,6-7,0.

[0048] En el análisis de masas de la digestión con tripsina de la nueva mancha de proteína se efectuó para 21 fragmentos y recurriendo a informaciones de banco de datos el intento de establecer una correspondencia con péptidos. En el resultado, doce de las correspondencias obtenidas correspondían a fragmentos de la cadena proteínica de la fosfoproteína LASP-1 (ID SEC N°: 1). La llamada "Sequence Coverage" ("Cobertura de Secuencia") era de un 39%, lo cual según los reconocidos criterios habituales en la especialidad debe considerarse como inequívoca identificación de la proteína contenida en la mancha como cadena proteínica de LASP-1.

[0049] Así pudieron ponerse en correspondencia p. ej. los siguientes fragmentos de masa de la cadena proteínica de LASP-1 (ID SEC N°: 1): 1202,714; 1254,615; 1291,745; 1360,813; 1418,898; 1443,959; 1489,826; 1551,943; 1604,040; 1608,960; y concretamente la correspondencia era según MS-Fit 3.3.1. Protein Prospector 3.4.1., Database NCBI nr. 7.25.2002 como se indica a continuación:

[0050] La masa 1202,714 (MH^+) corresponde a la secuencia QQSELQSQVR (ID SEC N°: 2). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1201,604. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 76-95.

[0051] La masa 1254,615 corresponde a la secuencia ACFHCETCK (ID SEC N°: 3). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1253,498. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 28-36.

[0052] La masa 1291,745 corresponde a la secuencia KPYCNAHYPK (ID SEC N°: 4). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1290,617. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 50-59.

[0053] La masa 1360,813 corresponde a la secuencia VNCLDKFWHK (ID SEC N°: 5). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1359,675. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 18-27.

[0054] La masa 1418,898 corresponde a la secuencia GFSVVADTPELQR (ID SEC N°: 6). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1417,719. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 97-109.

[0055] La masa 1443,959 corresponde a la secuencia LKQQSELQSQVR (ID SEC N°: 7). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1442,783. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 74-85.

[0056] La masa 1489,826 corresponde a la secuencia MGPSGGEGMEPERR (ID SEC N°: 8). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1488,644. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 131-144.

[0057] La masa 1551,943 fue puesta en correspondencia con la secuencia TGDTGMLPANYVEAI (ID SEC N°: 9). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1550,728. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 una secuencia de este tipo se halla en las posiciones 247-261.

[0058] La masa 1604,040 corresponde a la secuencia GKGFSVVADTPELQR (ID SEC N°: 10). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1602,836. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 95-109.

[0059] La masa 1608,960 corresponde a la secuencia QSFTMVADTPENLR (ID SEC N°: 11). El peso molecular teórico de este fragmento es de 1607,761. En la secuencia de aminoácidos de LASP-1 esta secuencia se halla en las posiciones 60-73.

[0060] Nueve de los diez fragmentos identificados descritos se hallan en el segmento de los aminoácidos 1-200 de LASP-1, es decir, en aquel segmento proteico que está situado antes del llamado dominio SH3, que comienza en el aminoácido 202. Una coincidencia de este tipo se considera según reconocidos principios interpretativos como una

segura identificación del producto de la mancha de proteína como una proteína que coincide con la LASP-1 al menos en la región de los aminoácidos 1-200. El peso molecular de la LASP-1 no fosforilada (261 aminoácidos; véase la ID SEC N°: 1) es sin embargo tan sólo de 29717 daltons. Es sin embargo sabido por la literatura que la LASP-1 en determinaciones de la masa molar por electroforesis en gel parece presentar un comportamiento irregular, con lo cual las desviaciones halladas de las masas molares no están necesariamente en contracción con identificar la sustancia hallada como LASP-1 con la secuencia de aminoácidos según la ID SEC N°: 1.

[0061] Sin embargo, tampoco puede excluirse totalmente la posibilidad de que el producto detectado se diferencie de la mencionada LASP-1, siendo p. ej. el producto de un corte y empalme alternativo. Por consiguiente, para sondear la posibilidad de que pudiese haberse tratado de otro producto de expresión análogo, se llevó a cabo una investigación posterior encaminada a sondear la posibilidad de una correspondencia de la mancha de proteína hallada a una proteína más larga considerablemente análoga. Estas investigaciones, que fueron llevadas a cabo a continuación recurriendo a informaciones que figuran implícitamente en bancos de datos de cDNA, condujeron a la detección de una proteína más larga que está emparentada con la LASP-1, es supuestamente el producto de un corte y empalme alternativo y en lugar del dominio SH3 presenta un resto de aminoácidos C-terminal alternativo de 123 aminoácidos. La proteína presenta los mismos aminoácidos 1-200 como la LASP-1, por lo cual podría ser de esperar una inmunoreactividad equiparable a la de LASP-1. A la mencionada proteína análoga se le dio la denominación LAP-1. En el siguiente Capítulo 5 se dan datos más detallados acerca de su identificación.

4. Determinación inmunodiagnóstica de inmunoreactividades de LASP-1 en sueros de pacientes humanos

4.1 Inmunoensayos – material y métodos

4.1.1. Síntesis de péptidos

[0062] Sacadas de la conocida secuencia de aminoácidos de la LASP-1 humana fueron seleccionadas tres regiones (Pos. 121-137: región peptídica 1; Pos. 147-159: región peptídica 2; Pos. 170-187: región peptídica 3). Completadas respectivamente con un resto de cisteína N-terminal, las regiones fueron sintetizadas químicamente como péptidos solubles según procedimientos estándar, purificadas, sometidas a control de calidad mediante espectrometría de masas y HPLC (HPLC = Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) de Fase Inversa, y liofilizadas en partes alícuotas (Firma JERINI AG, de Berlín, Alemania). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos sintéticos son las siguientes:

Péptido PKE18 CKYHEEFKSRMGPSGGE (ID SEC N°: 13)

Péptido PQQ14 CQDGSSYRRPLEQQ (ID SEC N°: 14)

Péptido PVK19 CVYQQPQQQPVAQSYGGYK (ID SEC N°: 17)

[0063] Además se sintetizó como péptido patrón el péptido siguiente, que se componía de las posiciones 121-137, 147-159 y 170-187 de la LASP-1 según la ID SEC N°: 1:

Péptido PKK54 KYHEEFKSRMGPSGEGGGQDGSSYRRPLEQQGGGVYQQPQQQ-PVAQSYGGYK (ID SEC N°: 15)

[0064] Para la selección de péptidos fueron decisivas las consideraciones siguientes:

[0065] La proteína LASP-1 que comprende 261 aminoácidos contiene dos potenciales dominios de unión a proteína, que son concretamente el dominio LIM en el terminal N (Pos. 5-56) y el dominio SH3 en el terminal C (Pos. 202-261) (véase Tomasetto et al., en el lugar indicado, 1995). Es hasta la fecha desconocido si la LASP-1 establece uniones a proteína por medio de estos dominios y cuáles son las uniones a proteína que eventualmente establece. Están descritos como adicionales características estructurales de la LASP-1 dos posibles dominios de unión a actina. Éstos están situados directamente uno a continuación del otro en la región de las Pos. 61-133 (Schreiber et al., en el lugar indicado, 1998), y se ha demostrado que la LASP-1 puede realmente unirse a actina (Schreiber et al., en el lugar indicado, 1998). La unión a actina es influenciada mediante fosforilación en las posiciones 99 y 146 (Chew et al., en el lugar indicado, 2002).

[0066] Para el desarrollo de inmunoensayos para LASP-1 y para comprobar la cuestión de si la LASP-1 puede ser también detectada extracelularmente, es decir, como inmunoreactividad en muestras de suero/plasma humanas normales y patológicas, los inventores se orientaron en las anteriormente descritas y conocidas informaciones sobre la estructura de la LASP-1: Fueron seleccionados para la inmunización tres péptidos que no están situados en la región de los dominios LIM y SH3, puesto que estos dominios en la LSP-1 posiblemente podrían no estar accesibles para anticuerpos debido al hecho de estar unida una proteína a los mismos. Por añadidura, los tres péptidos seleccionados no contienen los sitios de fosforilación descritos. Para uno de los péptidos se admitió que caiga en parte en una posible región de unión a actina.

4.1.2. Conjugación e inmunización

[0067] Mediante MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) los péptidos PKE18, PQQ14 y PVK19

fueron respectivamente conjugados con la proteína portadora KLH (Keyhole limpet hemocyanin = hemocianina de lapa californiana) (véanse las instrucciones de trabajo “NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers” de la firma PIERCE, de Rockford, IL, EE.UU.). Con estos conjugados fueron inmunizadas ovejas según el esquema siguiente: Cada oveja recibió inicialmente 100 µg de conjugado (estando el dato de la masa referido al porcentaje de péptido del conjugado) y a continuación cada 4 semanas 50 µg de conjugado (estando el dato de la masa referido al porcentaje de péptido del conjugado). Comenzando en el cuarto mes después del comienzo de la inmunización fueron extraídos cada 4 semanas por cada oveja 700 ml de sangre, y a partir de los mismos fue obtenido antisuero mediante centrifugación. Las conjugaciones, las inmunizaciones y la obtención de antisueros fueron efectuadas por la firma MicroPharm, de Carmarthenshire, R.U.

10 4.1.1.3. Purificación de los anticuerpos

[0068] En un procedimiento de 1 paso fueron preparados a partir de los antisueros que habían sido obtenidos comenzando en el cuarto mes después de la inmunización los anticuerpos péptido-específicos.

15 [0069] Para ello, primeramente los péptidos PKE18, PQQ14 y PVK19 fueron acoplados a gel SulfoLink (véanse las instrucciones de trabajo “SulfoLink Kit” de la firma PIERCE, de Rockford, IL, EE.UU.). Al hacerse esto se ofrecieron para el acoplamiento 5 mg de péptido por cada 5 ml de gel.

[0070] La purificación por afinidad de anticuerpos péptido-específicos de antisueros de oveja contra ambos péptidos fue realizada de la manera siguiente:

20 Las columnas de péptido fueron lavadas primeramente tres veces de manera alternativa con respectivamente 10 ml de tampón de elución (ácido cítrico 50mM, pH 2,2) y de tampón de unión (fosfato sódico 100mM, 0,1% de Tween, pH 6,8). 50 ml de los antisueros fueron filtrados a través de un filtro de 0,2 µm y mezclados con el material de columna existente. Para ello el gel fue barrido cuantitativamente de la columna con 10 ml de tampón de unión. La incubación se efectuó durante la noche a temperatura ambiente y bajo agitación. Las preparaciones fueron pasadas cuantitativamente a columnas vacías (NAP 25, Pharmacia, vaciadas). Los filtrados fueron desechados. A continuación se efectuó lavado con 250 ml de tampón de unión exento de proteína (contenido de proteína del eluido de lavado < 0,02 A280 nm). Se aportó tampón de elución a las columnas lavadas, y se recogieron fracciones de 1 ml cada una. 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.). Las fracciones con concentraciones de proteína > 0,8 mg/ml fueron reunidas, neutralizadas con tampón de PBS (PBS = solución salina tamponada con fosfato), y con ello diluidas a concentraciones de proteína de aproximadamente 1 mg/ml. Las producciones fueron las siguientes: 45 mg de anticuerpo anti-PKE18, 59 mg de anticuerpo anti-PQQ14 y 14 mg de anticuerpo anti-PVK19.

4.1.4. Marcación

35 [0071] Para la marcación por quimioluminiscencia de los anticuerpos, 100 µl del anticuerpo anti-PVK19 (1 mg/ml) y respectivamente 125 µl del anticuerpo anti-PQQ14 (0,8 mg/ml) fueron respectivamente mezclados con 10 µl de MA70-acridinio-NHS-éster (1 mg/ml; firma HOECHST Behring) e incubados por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces fueron añadidos en cada caso 400 µl de glicina 1M, y se efectuó incubación por espacio de otros 10 minutos. A continuación, por medio de columnas de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) se les cambió el tamponamiento a las preparaciones de marcación en en cada caso 1 ml de eluyente A (fosfato de potasio 50mM, NaCl 100mM, pH 7,4) según las instrucciones de trabajo, y se las liberó con ello de componentes de bajo peso molecular. Para la separación de los últimos restos de etiquetas no unidas a anticuerpos se realizaron HPLCs de filtración en gel (columna: Waters Protein Pak SW300). Las muestras fueron cargadas y cromatografiadas con eluyente A con un caudal de 1 ml/min. 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 de los anticuerpos fue para ambos anticuerpos en el pico de 0,10. Las fracciones con contenido de anticuerpos monómeros (tiempo de retención 8-10 min.) fueron reunidas y recogidas en 3 ml de fosfato sódico 100mM, NaCl 150mM, albúmina de suero bovino al 5% y azida sódica al 0,1%, pH 7,4.

4.1.5. Acoplamiento

50 [0072] Tubitos de poliestireno de 5 ml irradiados (de la firma Greiner) fueron recubiertos con anticuerpos anti-PQQ14 y con anticuerpos anti-PKE18 de la manera siguiente: Los anticuerpos fueron diluidos con Tris 50mM, NaCl 100mM, 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 10mM, Karion FP al 2% y albúmina de suero bovino al 0,3%, pH 6,5. Tras 20 horas fue aspirada la solución. Finalmente los tubitos fueron secados en un secador al vacío.

4.2. Realización y evaluación de los inmunoensayos

55 4.2.1. Estructuración y realización de los ensayos

[0073] Se fabricó un tampón de ensayo con la composición siguiente:

[0074] Fosfato sódico 100mM, NaCl 150mM, albúmina de suero bovino al 5%, IgG de oveja inespecífica al 0,1%, azida sódica al 0,1%, pH 7,4.

5 [0075] Sirvió de material patrón un péptido artificial sintetizado químicamente PKK54, que contiene las Pos. 121-137, 147-159 y 170-187 de LASP-1 (ID SEC N°:15). Este péptido fue diluido serialmente en suero normal de caballo (de la firma SIGMA). A los patrones así fabricados les fueron atribuidas concentraciones según la pesada de péptido.

[0076] Fueron muestras de medición sueros o plasmas tratados con EDTA (EDTA = ácido etilendiaminotetraacético) de sujetos aparentemente sanos, de pacientes con sepsis, de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y de pacientes con infarto de miocardio.

10 [0077] Fueron efectuados tres tipos de ensayos en sándwich. Se usaron en ello las siguientes combinaciones de anticuerpos:

Tubito: anti-PKE18 / indicador: anti-PVK19

Tubito: anti-PQQ14 / indicador: anti-PKE18

Tubito: anti-PQQ14 / indicador: anti-PVK19

15 [0078] Todos los ensayos se realizaron como se indica a continuación:

Se pipetaron al interior de los tubitos de ensayo en cada caso 50 µl de patrón o muestra, así como 150 µl de tampón de ensayo. Se efectuó incubación por espacio de dos horas a 22°C con sacudimiento. Luego se efectuaron 4 lavados con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) por tubito en cada uno. Entonces se pipetaron al interior de cada tubito 200 µl de tampón de ensayo que contenía 0,5 millones de RLU (RLU = unidades relativas de luz) del anticuerpo indicador marcado con MA70. Se efectuó incubación por espacio de dos horas a 22°C con sacudimiento. Entonces se efectuaron 4 lavados con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) por tubito en cada uno, se dejó que se escurriesen los tubitos, y se midió la quimioluminiscencia unida al tubito en un luminómetro (de la firma BERTHOLD, LB952T; reactivos de base de la BRAHMS AG).

[0079] Usando el software MultiCalc (Spline Fit) fue leída la concentración de inmunorreactividad de LASP-1.

25 4.2.2. Resultados

[0080] Sorprendentemente se puso de manifiesto que con todos los tres ensayos en sándwich anteriormente descritos era detectable en los sueros de los pacientes de sepsis una clara y equiparable inmunorreactividad de LASP-1 (véase la Figura 3). Esta inmunorreactividad era claramente superior a la de las muestras de control de sujetos sanos. La demostrada aparición de inmunorreactividad de LASP-1 en la circulación sanguínea era sorprendente considerando los antecedentes de los conocimientos conocidos que se tiene sobre la LASP-1, puesto que la LASP-1 no contiene características estructurales (como una secuencia señal) que hiciesen previsible una localización extracelular de la molécula. Tampoco el estado de la técnica da indicación alguna de una posibilidad de localización de este tipo. Antes bien está descrita una localización intracelular en extensiones de la membrana celular (Schreiber et al., en el lugar citado, 1998).

30 [0081] Con uno de los ensayos (tubito: anti-PQQ14 / indicador: anti-PVK19) se efectuaron mediciones más extensivas. Sirvieron ahí para la estandarización diluciones de péptido patrón PKK54 en suero de caballo. Con ello se confirmó el claro incremento de la inmunorreactividad de LASP-1 en un elevado número de casos de sueros de pacientes con sepsis (Figura 4). Se determinó una inmunorreactividad asimismo incrementada con respecto a los controles sanos también para pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Figura 5), y, de manera algo menos pronunciada, para pacientes con infarto de miocardio (Figura 6).

4.2.3. Indicaciones sobre las uniones a proteína de LASP-1 en suero

[0082] Las intensidades de señal para las distintas muestras de suero – poco más o menos proporcionales a la concentración de analito en el inmunoensayo en sándwich – estaban correlacionadas entre tres distintos ensayos (Figura 3). Esta correlación indica que todos los tres epítopes para la unión de los anticuerpos usados están accesibles de manera similar en todas las muestras medidas. Esto sería de esperar y no sería sorprendente para un analito que no estuviese unido a otras proteínas. Para LASP-1 ciertamente están descritas varias posibilidades de establecer uniones con proteínas (en el lugar citado). Uno de los epítopes (Pos. 121-137) está en solapamiento con un sitio de unión a actina. Así pues, obviamente este sitio de unión no está ocupado con inmunorreactividad de LASP-1 en el analito mensurable en el suero. Los otros dos epítopes (Pos. 147-159 y Pos. 170-187) están situados fuera de dominios de unión a proteína (sitios de unión a actina, LIM, SH3). Por consiguiente no es de esperar una influencia directa en la unión a anticuerpos ejercida en estos epítopes por proteínas eventualmente unidas. Sin embargo no puede excluirse la posibilidad de que en el caso de una unión a proteína pudiese llegar a producirse un indirecto impedimento estérico de la unión a anticuerpos. Sin embargo, éste no es obviamente el caso. No ha quedado aún probado mediante los presentes análisis si la inmunorreactividad de LASP-1 está realmente libre en el suero, y ello debería establecerse dado el caso mediante adicionales investigaciones.

5. Identidad de la inmunorreactividad de LASP-1 en suero

5 [0083] Una comparación de las secuencias de aminoácidos de los tres péptidos que se usaron para la producción de los anticuerpos anti-LASP-1, que son los péptidos PKE18 (Pos. 121-137 en LASP-1; ID SEC N°: 13), PQQ14 (Pos. 147-159 en LASP-1; ID SEC N°: 14) y PVK19 (Pos. 170-187 en LASP-1; ID SEC N°: 17), con las secuencias registradas en el banco de datos GenBank de todas las proteínas humanas conocidas y de las proteínas derivadas de cDNAs puso de manifiesto que además de la LASP-1 (p. ej. N° de accesoión BC012460) existe una segunda proteína que contiene estas secuencias (N° de accesoión BC007560). A esta proteína se la denomina de aquí en adelante LAP-1. A la misma puede asignársele la secuencia según la ID SEC N°: 16. Así pues, la inmunorreactividad medida con los inmunoensayos anteriormente descritos podría proceder tanto de la propia LASP-1 (ID SEC N°: 1) como de la LAP-1 (ID SEC N°: 16).

10 [0084] No ha llegado a conocimiento de la solicitante estado de la técnica alguno sobre la LAP-1 que vaya más allá de anotaciones sobre la estructura primaria en el banco de datos. Para obtener una información más detallada sobre la estructura y la génesis de LASP-1 en comparación con LAP-1, fueron por consiguiente efectuados por los propios inventores análisis de mayor alcance cuyos resultados se resumen a continuación:

15 [0085] La LASP-1 y la LAP-1 resultan evidentemente de un distinto producto de corte y empalme del transcrito primario de un mismo gen: Las secuencias de los cDNAs de LASP-1 y LAP-1 (Núms. de accesoión BC007560 y BC012460) fueron comparadas con la secuencia del genoma humano. Con ello fue localizado un correspondiente gen en el cromosoma 17, cerca de 17q21, región 39,023K-39,076K. Mediante la comparación de secuencias pudo deducirse una estructura de exón/intrón del gen. Los cDNAs para LASP-1 y LAP-1 resultan del corte y empalme de ocho exones. Los exones 2-5 no se diferencian para ambos cDNAs. Los exones 6, 7 y 8 no son sin embargo idénticos en ambos cDNAs, pero se solapan. El exón 1 se diferencia en ambos cDNAs con respecto a la longitud en el terminal 5'. Sigue sin estar claro si las distintas longitudes del exón 1 de ambos cDNAs son el resultado de distintas iniciaciones de la transcripción o bien de distintas interrupciones en la transcripción inversa de los mRNAs. La región traducida llega para ambos cDNAs de la región 3' a la región 5' del exón 7: Las secuencias de aminoácidos de ambos productos de traducción son idénticas hasta el aminoácido prolina (Pos. 200), pero son a continuación completamente distintas (véase la ID SEC N°: 1 en comparación con la ID SEC N°: 16). La LASP-1 comprende en total 261 aminoácidos, y la LAP-1 comprende 323 aminoácidos. En la LASP-1 el dominio SH3 comienza en la posición 202. Precisamente esta región SH3 no está presente en la LAP-1, sino que está sustituida por otra región de función desconocida. La falta del dominio SH3 en la LAP-1 condujo a su denominación (en la "LASP-1" la S corresponde a dominio SH3).

25 [0086] Tanto para LASP-1 como para LAP-1 hay ESTs (expressed sequence tags = marcadores de secuencia expresada) en el correspondiente banco de datos GenBank "Human EST entries" ("registros de EST humanos") (como p. ej. BU553748 para LASP-1 y BG281978 para LAP-1). Esto indica inequívocamente que los anteriormente descritos registros BC007560 y BC012460 no son observaciones singulares o incluso artefactos, y apunta más bien a que ambas variantes de corte y empalme son realmente expresadas. Se desconoce bajo qué condiciones el gen es sin embargo expresado en LASP-1 o LAP-1.

30 [0087] Sobre la base de la considerable identidad de secuencia con la LASP-1, también una determinación y/o codeterminación de LAP-1 debe considerarse como determinación según la presente invención.

35 [0088] Si para un procedimiento de determinación se eligen los reactivos de forma tal que la determinación pueda distinguir entre LASP-1 y LAP-1, p. ej. eligiendo en un ensayo en sándwich las contrapartes de unión (unidas a la fase fija o marcadas) de forma tal que al menos una de ellas identifique específicamente un epítipo en la parte C-terminal encima de la posición 200 de LAP-1 o LASP-1, y en particular encima de la posición 200 de LAP-1, puede verificarse si la inmunorreactividad de LASP-1 determinada en un fluido biológico es atribuible en su totalidad o en parte a la LAP-1, y puede determinarse la LAP-1 también en solitario junto a la LASP-1, o junto a la cantidad total de LASP-1 y LAP-1, y gracias a ello puede sondearse con más precisión la relevancia clínica de una presencia de LAP-1 para la sepsis y/o la enfermedad de Alzheimer.

Potencial terapéutico de los nuevos conocimientos

40 [0089] Está pendiente de aclaración qué función tiene en la circulación sanguínea la marcadamente incrementada inmunorreactividad de LASP-1 observada en condiciones patológicas. Pero ya la circunstancia de que un incremento está asociado a un estado patológico sugiere la suposición de que la inmunorreactividad de LASP-1 participa en el mecanismo molecular de la enfermedad o bien en el intento del propio cuerpo de combatir la enfermedad, y de que posiblemente desempeña incluso un papel clave en ello. Es por consiguiente muy prometedora la realización de adicionales investigaciones con miras terapéuticas sobre la base de los conocimientos que se exponen en la presente solicitud. Según que la inmunorreactividad de LASP-1 sea más bien perjudicial o bien útil, se obtendrá una utilidad terapéutica ya sea mediante una reducción o bien mediante un incremento de la inmunorreactividad de LASP-1 provocados de manera exógena.

45 [0090] Las incrementadas concentraciones de LASP-1 o dado el caso de LAP-1 constatadas por vez primera permiten su uso como nuevos biomarcadores para sepsis y Alzheimer y también en relación con el infarto de miocardio. La aparición de LASP-1 en la circulación de pacientes de sepsis, Alzheimer e infarto de miocardio que ha

sido demostrada por primera vez y acompaña a la enfermedad, abre además nuevos e interesantes puntos de partida para la investigación para la terapia de las correspondientes enfermedades.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0091]

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

<120> Procedimiento para la diagnosis de enfermedades inflamatorias e infecciones mediante la determinación de la inmunorreactividad de LASP-1

<130> 3677PCT AS

<140>

<141>

<150> 02008840.7

<151> 2002-04-19

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Asn	Pro	Asn	Cys	Ala	Arg	Cys	Gly	Lys	Ile	Val	Tyr	Pro	Thr	Glu
1				5					10					15	
Lys	Val	Asn	Cys	Leu	Asp	Lys	Phe	Trp	His	Lys	Ala	Cys	Phe	His	Cys
			20					25					30		
Glu	Thr	Cys	Lys	Met	Thr	Leu	Asn	Met	Lys	Asn	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Glu
		35					40					45			
Lys	Lys	Pro	Tyr	Cys	Asn	Ala	His	Tyr	Pro	Lys	Gln	Ser	Phe	Thr	Met
	50					55					60				
Val	Ala	Asp	Thr	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu
65					70					75					80
Gln	Ser	Gln	Val	Arg	Tyr	Lys	Glu	Glu	Phe	Glu	Lys	Asn	Lys	Gly	Lys
				85					90					95	
Gly	Phe	Ser	Val	Val	Ala	Asp	Thr	Pro	Glu	Leu	Gln	Arg	Ile	Lys	Lys
			100					105					110		
Thr	Gln	Asp	Gln	Ile	Ser	Asn	Ile	Lys	Tyr	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Lys
		115					120					125			
Ser	Arg	Met	Gly	Pro	Ser	Gly	Gly	Glu	Gly	Met	Glu	Pro	Glu	Arg	Arg
	130					135					140				
Asp	Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	Ser	Tyr	Arg	Arg	Pro	Leu	Glu	Gln	Gln	Gln
145					150					155					160
Pro	His	His	Ile	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Val	Tyr	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln
				165					170					175	
Gln	Pro	Val	Ala	Gln	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Lys	Glu	Pro	Ala	Ala	Pro
			180					185					190		
Val	Ser	Ile	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg
		195					200					205			

Ala Val Tyr Asp Tyr Ser Ala Ala Asp Glu Asp Glu Val Ser Phe Gln
 210 215 220
 Asp Gly Asp Thr Ile Val Asn Val Gln Gln Ile Asp Asp Gly Trp Met
 225 230 235 240
 Tyr Gly Thr Val Glu Arg Thr Gly Asp Thr Gly Met Leu Pro Ala Asn
 245 250 255
 Tyr Val Glu Ala Ile
 260

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Gln Gln Ser Glu Leu Gln Ser Gln Val Arg
 1 5 10

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ala Cys Phe His Cys Glu Thr Cys Lys
 1 5

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Lys Pro Tyr Cys Asn Ala His Tyr Pro Lys
 1 5 10

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Val Asn Cys Leu Asp Lys Phe Trp His Lys
 1 5 10

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Gly Phe Ser Val Val Ala Asp Thr Pro Glu Leu Gln Arg
 1 5 10

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Leu Lys Gln Gln Ser Glu Leu Gln Ser Gln Val Arg
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Gly Pro Ser Gly Gly Glu Gly Met Glu Pro Glu Arg Arg
 1 5 10

<210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 9
 Cys Val Tyr Gln Gln Pro Gln Gln Gln Pro Val Ala Gln Ser Tyr Gly
 1 5 10 15

Gly Tyr Lys

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Thr Gly Asp Thr Gly Met Leu Pro Ala Asn Tyr Val Glu Ala Ile
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Gly Lys Gly Phe Ser Val Val Ala Asp Thr Pro Glu Leu Gln Arg
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Gln Ser Phe Thr Met Val Ala Asp Thr Pro Glu Asn Leu Arg
 1 5 10

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 13
 Cys Lys Tyr His Glu Glu Phe Glu Lys Ser Arg Met Gly Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Glu

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

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 14
 Cys Gln Asp Gly Ser Ser Tyr Arg Arg Pro Leu Glu Gln Gln
 1 5 10

<210> 15
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 15
 Lys Tyr His Glu Glu Phe Glu Lys Ser Arg Met Gly Pro Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Glu Gly Gly Gly Gln Asp Gly Ser Ser Tyr Arg Arg Pro Leu Glu Gln
 20 25 30
 Gln Gly Gly Gly Val Tyr Gln Gln Pro Gln Gln Gln Pro Val Ala Gln
 35 40 45
 Ser Tyr Gly Gly Tyr Lys
 50

<210> 16
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Asn Pro Asn Cys Ala Arg Cys Gly Lys Ile Val Tyr Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Asn Cys Leu Asp Lys Phe Trp His Lys Ala Cys Phe His Cys
 20 25 30
 Glu Thr Cys Lys Met Thr Leu Asn Met Lys Asn Tyr Lys Gly Tyr Glu
 35 40 45
 Lys Lys Pro Tyr Cys Asn Ala His Tyr Pro Lys Gln Ser Phe Thr Met
 50 55 60
 Val Ala Asp Thr Pro Glu Asn Leu Arg Leu Lys Gln Gln Ser Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Gln Val Arg Tyr Lys Glu Glu Phe Glu Lys Asn Lys Gly Lys
 85 90 95
 Gly Phe Ser Val Val Ala Asp Thr Pro Glu Leu Gln Arg Ile Lys Lys
 100 105 110
 Thr Gln Asp Gln Ile Ser Asn Ile Lys Tyr His Glu Glu Phe Glu Lys
 115 120 125
 Ser Arg Met Gly Pro Ser Gly Gly Glu Gly Met Glu Pro Glu Arg Arg
 130 135 140
 Asp Ser Gln Asp Gly Ser Ser Tyr Arg Arg Pro Leu Glu Gln Gln Gln
 145 150 155 160
 Pro His His Ile Pro Thr Ser Ala Pro Val Tyr Gln Gln Pro Gln Gln
 165 170 175
 Gln Pro Val Ala Gln Ser Tyr Gly Gly Tyr Lys Glu Pro Ala Ala Pro
 180 185 190
 Val Ser Ile Gln Arg Ser Ala Pro Ile Cys Leu Gln His Ile Pro Arg
 195 200 205
 His Arg Ile Arg Pro Gly Arg Asp Pro Ser Ile Leu Gln Cys Leu Cys
 210 215 220
 Phe Leu Lys Pro Ala Thr Ala Cys Asp Ser Tyr Pro Ser Ser Ser Phe
 225 230 235 240
 Phe Cys Gln Leu Lys Pro Ser Ser Ala Thr Ser Ala Gly Ser Leu Leu
 245 250 255
 Trp Gln Ala Ser Pro Leu Ile Asp Phe Leu Val Phe Ser Leu Asp Gly
 260 265 270
 Thr Gly Met Gly Leu Ser Gly Gly Gly Arg Gly Pro Trp Gly Arg Ala
 275 280 285
 Gly Met Gly Asp Leu Leu Ala Cys Gly Pro His Leu Pro Leu Cys Ser
 290 295 300
 Leu Pro Ser His Pro Pro Ala Gln Leu Leu Thr Tyr Pro His Ile Pro
 305 310 315 320

Gly Leu Gly

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 17

Cys Val Tyr Gln Gln Pro Gln Gln Gln Pro Val Ala Gln Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Gly Tyr Lys

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento diagnóstico *in vitro* para la detección precoz y la detección, para la prognosis evolutiva y la valoración del grado de severidad y como acompañamiento a la terapia para la valoración de la evolución de infecciones sistémicas análogas a la sepsis y de la sepsis, del infarto de miocardio y de la enfermedad de Alzheimer, en el que en una muestra de suero o plasma de un paciente se determina en forma libre y/o en forma unida a proteína o en forma modificada postranslacional la presencia y/o cantidad de la proteína LASP-1 (ID SEC N°: 1) o de una proteína que sea secuencialmente idéntica a ésta al menos en la región de los primeros 200 aminoácidos y presente una inmunorreactividad correspondiente a la región mencionada, y de la presencia y/o cantidad de la inmunorreactividad de LASP-1 determinada se sacan conclusiones con respecto a la existencia de la infección sistémica análoga a la sepsis o de la sepsis, del infarto de miocardio o de la enfermedad de Alzheimer, a la evolución previsible o al grado de severidad de dichas enfermedades o al éxito de una terapia para las mismas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que en la determinación se determina o se codetermina la inmunorreactividad de una proteína o de un fragmento de la misma al que se denomina LAP-1 y que presenta la secuencia de aminoácidos según la ID SEC N°: 16.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por el hecho de que en la determinación se determina una inmunorreactividad que puede atribuirse a las posiciones 147 a 187 de LASP-1 (ID SEC N°: 1).
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que se determina la inmunorreactividad de una forma soluble formada postranslacionalmente de LASP-1 y/o LAP-1.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que es un procedimiento de determinación inmunodiagnóstica (inmunoensayo) del tipo sándwich.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que es un procedimiento de determinación inmunodiagnóstica en el que se usan reactivos anticuerpos que fueron producidos mediante inmunización con un péptido conjugado con una proteína portadora, siendo dicho péptido seleccionado de entre los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos según la ID SEC N°: 13, la ID SEC N°: 14 o la ID SEC N°: 17.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que es un procedimiento para la diagnosis de la sepsis, y dentro del marco de una determinación multiparamétrica se determina además de la inmunorreactividad de LASP-1 al menos un parámetro adicional que se selecciona de entre los miembros del grupo que consta de procalcitonina, CA 125, CA 19-9, S100B, proteínas S100A, fragmentos de citoqueratina solubles, y en particular CYFRA 21, TPS y/o fragmentos de citoqueratina-1 solubles (sCY1F), los péptidos inflamina y CHP, prohormonas peptídicas, la glicina-N-aciltransferasa (GNAT), la carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS 1) y la proteína C-reactiva (CRP) o fragmentos de los mismos.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que la determinación multiparamétrica se efectúa como determinación simultánea mediante un dispositivo de medición con tecnología de chips o un dispositivo de medición inmunocromatográfica.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por el hecho de que la evaluación del complejo resultado de medición obtenido con el dispositivo de medición se hace con ayuda de un programa de ordenador.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que se efectúa una determinación de LASP-1 y LAP-1 de forma tal que se determinan ambas conjuntamente.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que determinación de LASP-1 y/o LAP-1 se efectúa de forma tal que se obtienen valores de medición que son característicos de la presencia y/o de cantidades de solamente LASP-1 o de solamente LAP-1.

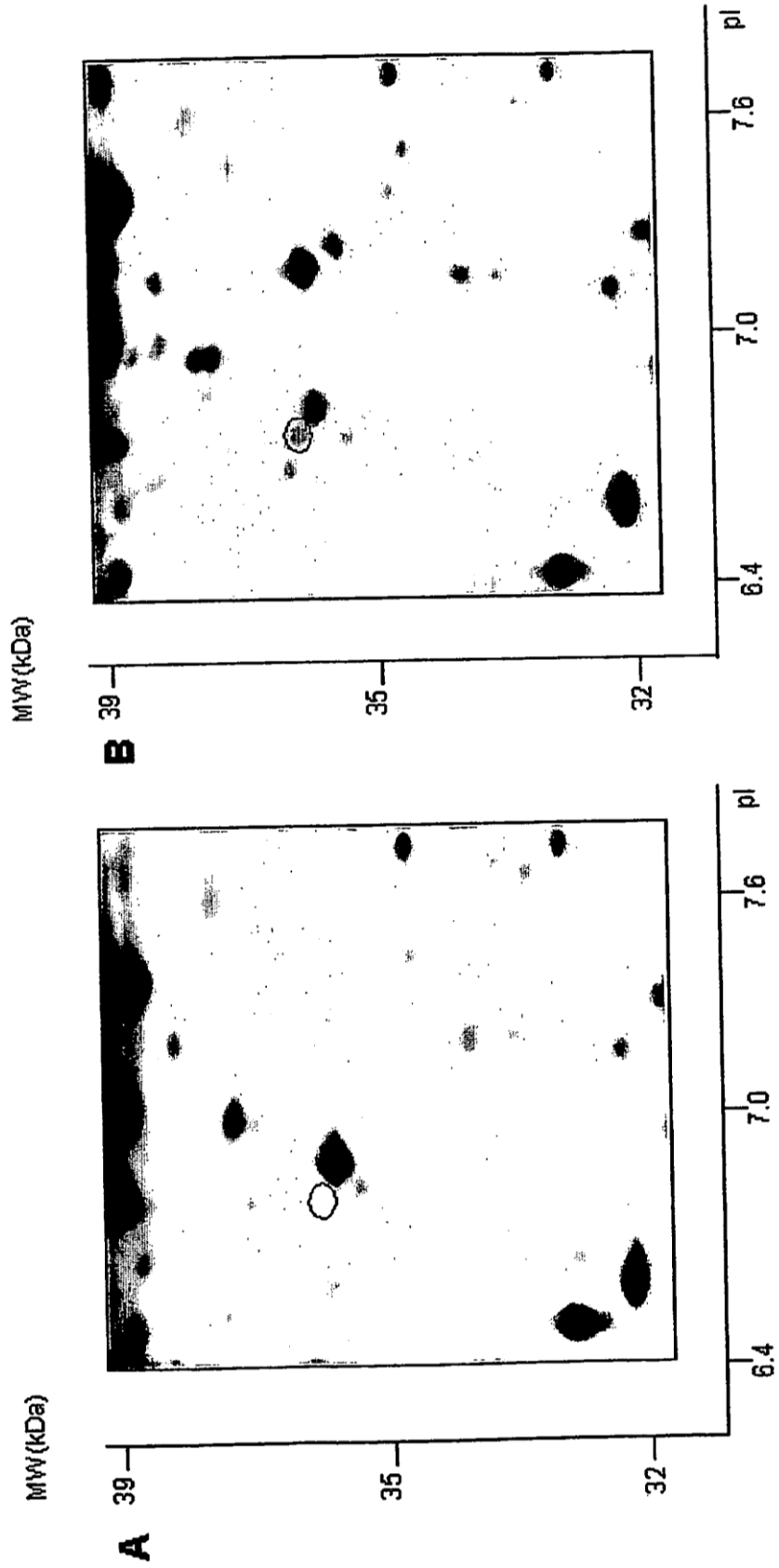


Fig. 1

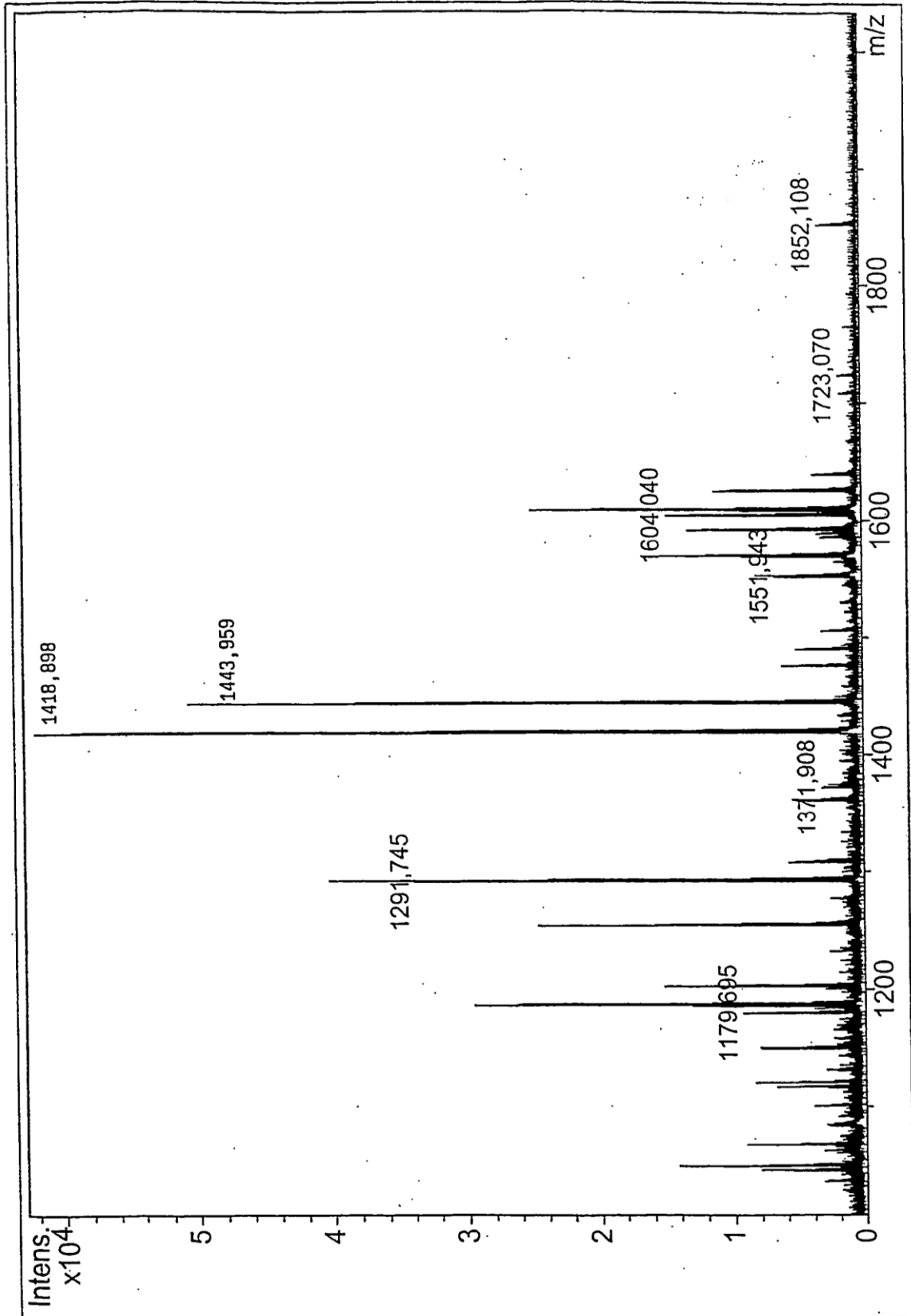
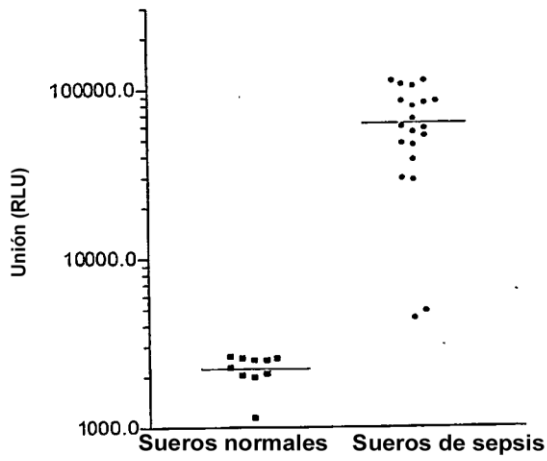
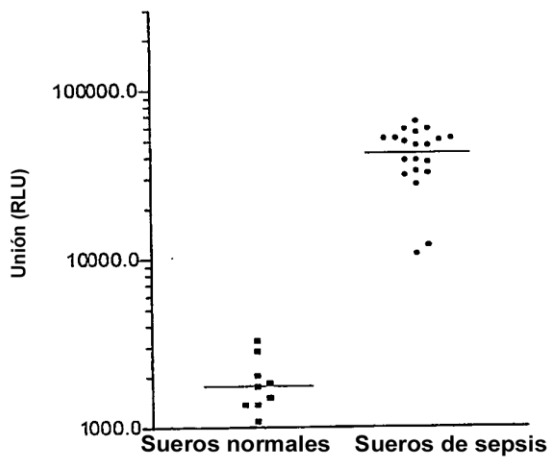


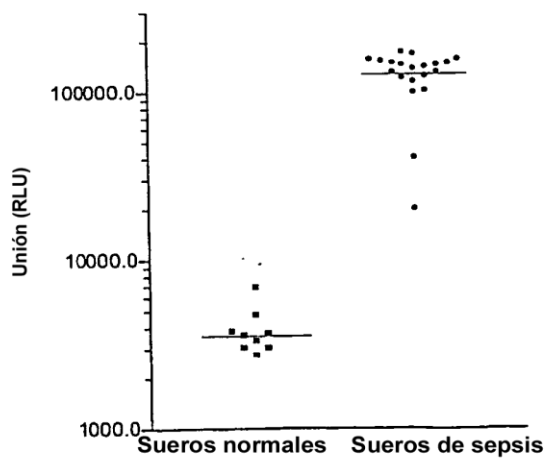
Fig. 2



Variante 1:
Fase fija: anti-PKE18
Indicador: anti-PVK19



Variante 2:
Fase fija: anti-PQQ14
Indicador; anti-PKE18



Variante 3:
Fase fija: anti-PQQ14
Indicador: anti-PVK19

Fig. 3

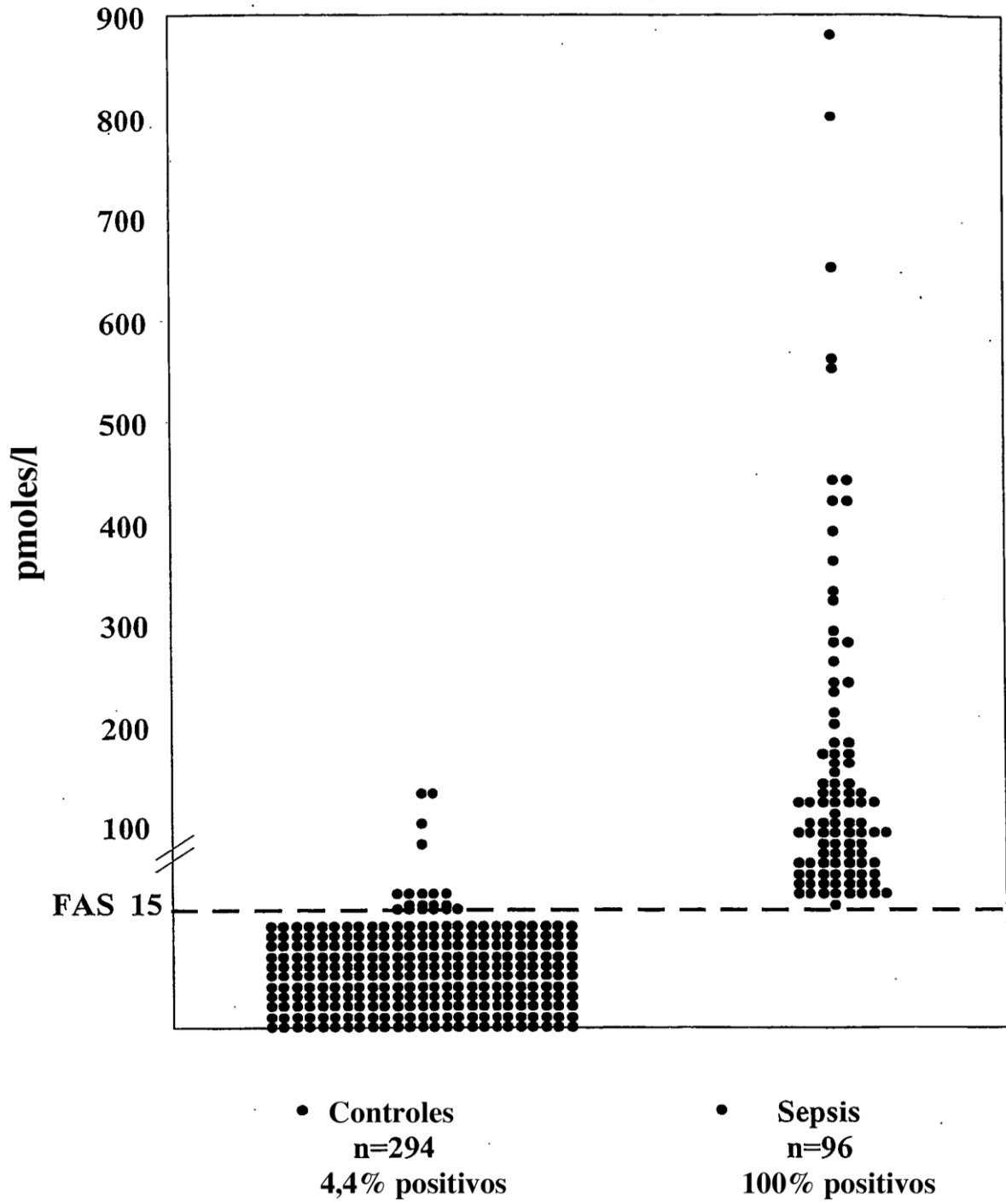


Fig. 4

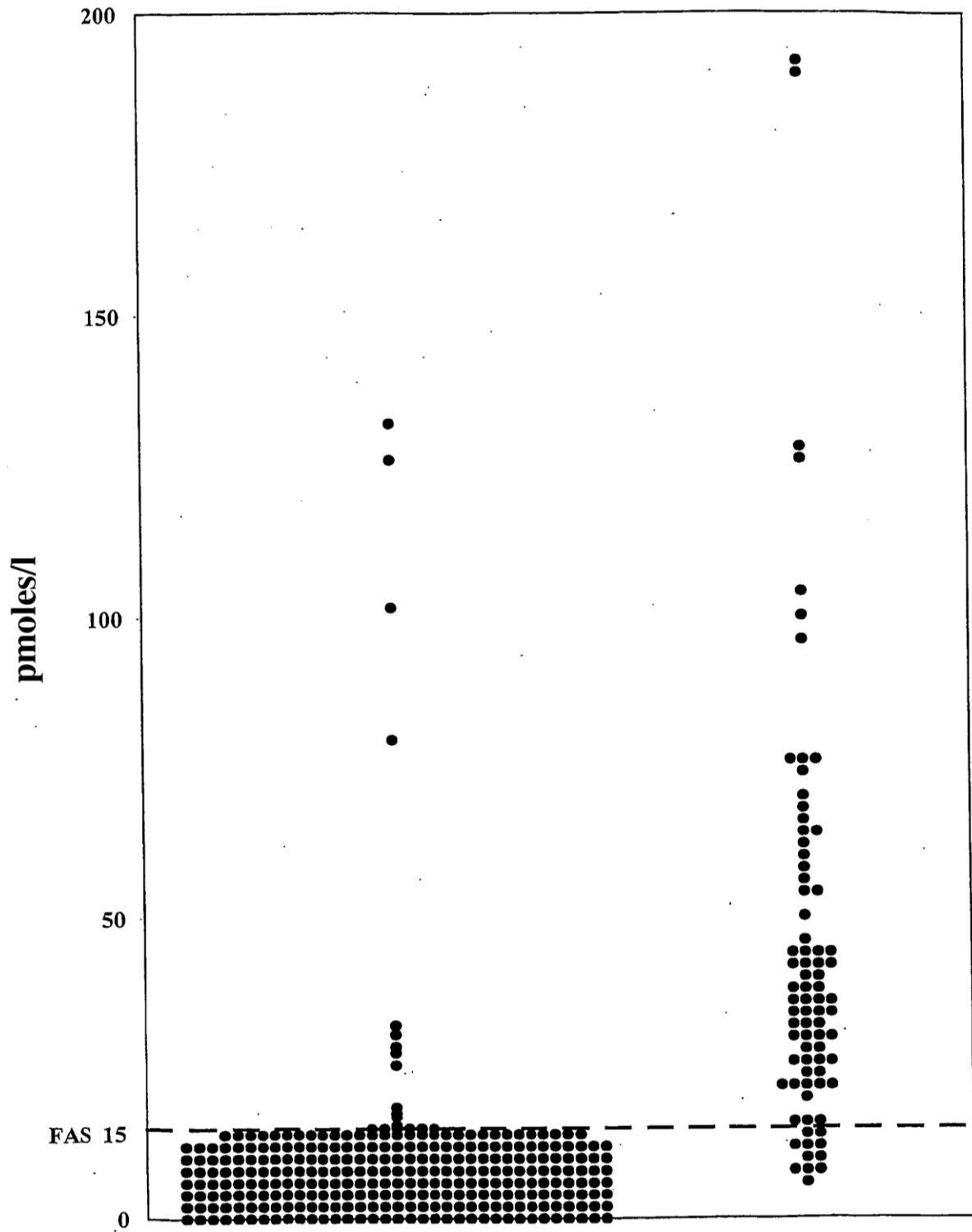


Fig. 5

● Controles
n=294
4,4% positivos

● Alzheimer
n=80
86,3% positivos

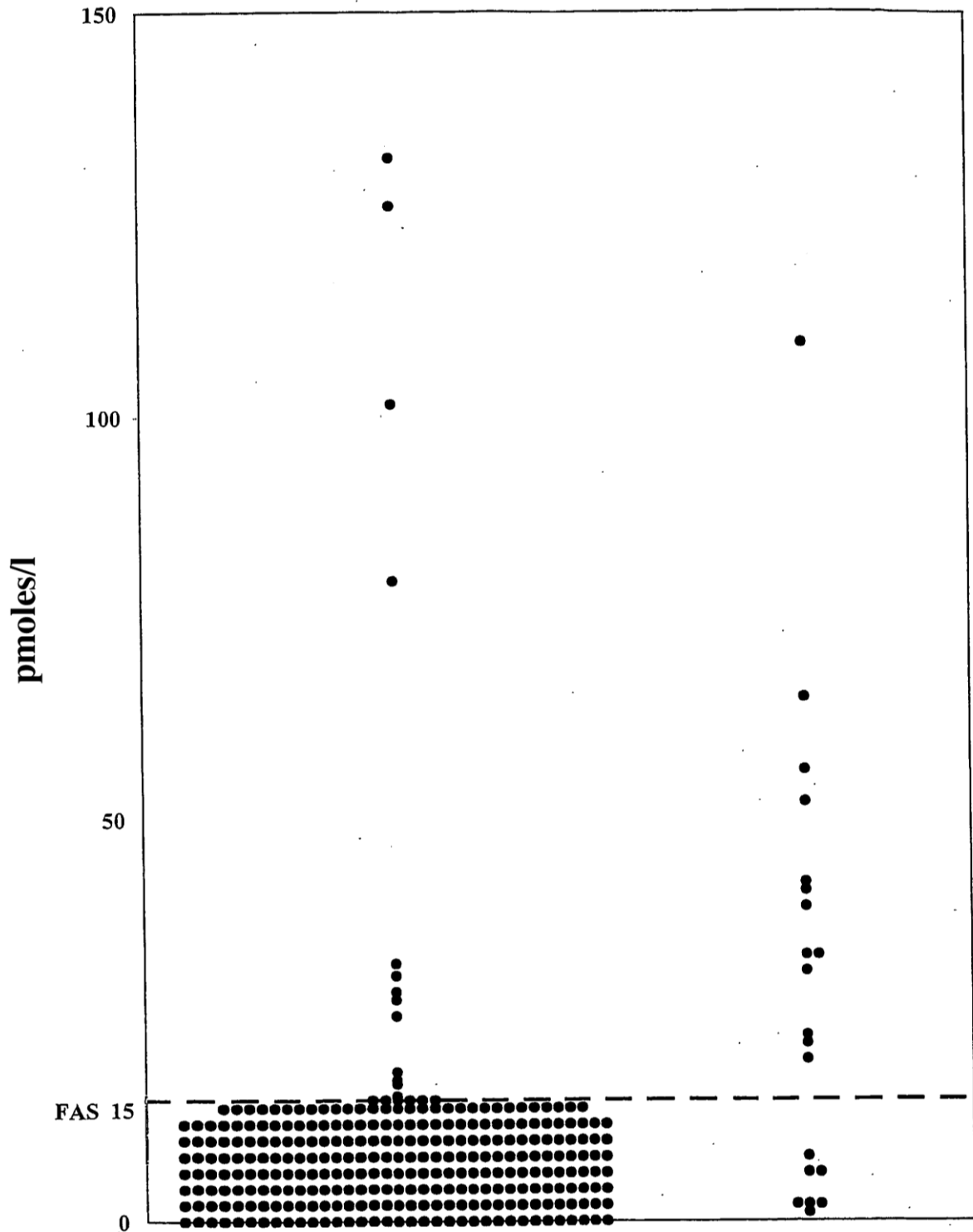


Fig. 6

● Controles
n=294
4,4% positivos

● Infarto de miocardio
n=20
65% positivos