

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 309**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2005 E 11165586 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2369350**

54 Título: **Utilización de precursores de taquicinas y/o de sus fragmentos en diagnóstico médico**

30 Prioridad:

20.04.2004 EP 04009284

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

05.12.2014

73 Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)

Tulpenweg 6

16556 Borgsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS y

SPARWASSER, ANDREA (GEB. ERNST)

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 524 309 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

Utilización de precursores de taquicininas y/o de sus fragmentos en diagnóstico médico.

- 5 La presente invención se refiere a la utilización de la protaquicininina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en el diagnóstico médico.

Se puede utilizar la protaquicininina para diagnosticar una variedad de enfermedades que comprenden enfermedades/trastornos del sistema nervioso central, que comprenden la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, depresión y/o afecciones de dolor, enfermedades neurológicas, endocrinológicas, cerebrales, musculares, locales, generales, crónicas, inflamatorias, enfermedades infecciosas que comprenden las infecciones bacterianas y víricas, meningitis, septicemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, anemia depreanocítica, isquemia, esclerosis lateral amiotrófica, artritis que comprende la artritis reumatoide, bronquitis, hiperalgesia, asma, la intoxicación que comprende la intoxicación bacteriana, trastornos inmunológicos, poli/traumatismo que comprende el traumatismo craneoencefálico, tumores/cáncer, accidente cerebrovascular, estrés, dermatitis atópica, VIH, enfermedad de Huntington, quemaduras, fibromialgia, esquizofrenia, la enfermedad de Hirschsprung, alergias, disautonomía familiar (síndrome de Riley Day), trastornos hematopoyéticos, gliomas que comprenden los glioblastomas y los astrocitomas, los trastornos de la barrera hematoencefálica.

20 Antecedentes de la invención

En 1931, Von Euler y Gaddum (Von Euler y Gaddum, 1931) aislaron el undecapéptido sustancia P. Se denominó sustancia P debido a su consistencia pulverulenta (Gaddum y Schild, 1934). La sustancia P (SP) está codificada por el gen preprotaquicininina A (PPT-A), que también comprende las secuencias génicas de otras taquicinininas como neurocinina A (NKA), neuropéptido K (NPK) y neuropéptido γ (NP γ) (Carter y Krause, 1990). La neurocinina B está codificada por el gen TPP II o PPT-B. La sustancia P se expresa en el sistema nervioso central (SNC), así como en el sistema nervioso periférico (SNP) (Otsuka y Yoshioka, 1993).

Las taquicinininas presentan diversas funciones. Tienen propiedades vasodilatadoras, son responsables de la contracción y relajación de los músculos lisos en el aparato digestivo y genitourinario, así como en los bronquios. Además, las taquicinininas desempeñan una función importante en los reflejos de defensa provocados por lesiones o enfermedades dolorosas. Estos son, por ejemplo, el aumento de la tonicidad cardiovascular, la vasodilatación y activación de la biosíntesis de NO. La sustancia P tiene una influencia sobre diferentes células inflamatorias, sirve como neurotransmisor para transmitir el dolor y tiene función reguladora en la formación de sangre. Las taquicinininas sin sustancia P Neurocinina A, Neuropéptido γ , así como el Neuropéptido K son propensas a desempeñar una función como reguladores de funciones endocrinas.

La concentración de sustancia P en los líquidos corporales se altera en varias enfermedades. En el plasma de pacientes de septicemia un aumento significativo de la concentración de sustancia P se muestra también en el plasma y el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Joyce, Yood y Carraway, 1993).

La sustancia P también parece desempeñar una función en las enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

- 45 La expresión de ARNm en la sustancia P aumenta significativamente en los macrófagos infectados por el VIH, lo que indica un efecto de esta taquicininina en infecciones por el VIH.

En el líquido de los pacientes de Alzheimer (de aparición tardía) y los pacientes que padecen esclerosis lateral amiotrófica se observa un aumento significativo de sustancia P.

50 En la enfermedad de Parkinson se observó una reducción o un aumento de sustancia P en el globo pálido medio en función del grado de reducción de dopamina en el putamen.

Los pacientes que padecen corea de Huntington, una enfermedad neurodegenerativa genéticamente dependiente, presentaban una pérdida selectiva de neuronas que contienen preprotaquicininina en el cerebro.

En el suero de los pacientes con isquemia cerebral (inhibición temporal de la circulación sanguínea, así como accidente cerebrovascular), se pudo determinar un aumento significativo en las concentraciones de la sustancia P.

60 Los pacientes con tumores carcinoides presentaban un aumento de la concentración de sustancia P y neuroquinina A en la circulación sanguínea, así como un aumento significativo en la inmunoreactividad de los metabolitos similares a la taquicininina en la orina. La sustancia P y la neuroquinina A posiblemente desempeñan también una función en la jaqueca, otros trastornos por sustancias farmacéuticas, en el desarrollo de glioma y tienen una fuerte influencia en la secreción en los bronquios y en la circulación bronquial, lo que sugiere que podrían desempeñar una posible función como mediadores en el asma.

En los fumadores que padecen bronquitis crónica podría presentarse un aumento de diez veces en la concentración de PPT-A-ARNm en las células epiteliales de los pulmones.

5 En la fibromialgia y la depresión aumenta la concentración de la sustancia P en el suero y el líquido, así como aumenta en el suero de pacientes que padecen anemia deprimada, especialmente en las fases dolorosas.

El aumento de las concentraciones de la sustancia P se mide en pacientes que padecen dermatitis atópica lo que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

10 Las taquicinas tales como la sustancia P y neuroquinina A, desempeñan además una función en la regulación de las respuestas de citocinas proinflamatorias.

15 La biosíntesis de las taquicinas comienza como preprohormona. Durante la biosíntesis después de la separación de la secuencia N-terminal hidrófoba por la llamada peptidasa señal y el plegamiento de las proteínas en el lumen del retículo endoplásmico, los propéptidos migran en las vesículas del aparato de Golgi y son transportados a la membrana celular. Durante el transporte, los propéptidos se procesan a hormonas maduras por prohormona-convertasas en secuencias de aminoácidos generalmente dibásicos. Mediante diferentes estímulos los péptidos se segregan en el espacio extracelular o en el plasma. Los péptidos maduros se inactivan rápidamente después de la secreción por proteólisis. La sustancia P y la neuroquinina A *in vivo* tienen una vida media sumamente baja inferior a 20 2 minutos en la sangre. El neuropéptido K presenta una degradación bifásica con una vida media de 0,9 minutos (degradación a neuropéptido γ) y 6 minutos en el plasma (degradación adicional).

25 La taquicina sustancia P, neuroquinina A, neuropéptido K y neuropéptido γ están codificadas por el gen preprotaquicina A (PPT-A). El corte y empalme alternativo del transcrito del gen PPT-A produce 4 moléculas diferentes de ARNm: α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A y δ PPT-A. Las cuatro moléculas de ARNm contienen la secuencia de la sustancia P. Sólo el ARNm β PPT-A contiene todos los 7 exones del gen PPTA y por lo tanto codifica las 4 taquicinas. El exón 6 no se encuentra en el mRNA α PPT-A y los exones 4 y 6 están desapareciendo en el mRNA δ PPT-A. Por lo tanto, sólo estos dos tipos de ARNm codifican la secuencia completa de la sustancia P. El exón 4 ha desapareciendo en el ARNm γ PPT-A, por lo tanto el neuropéptido K puede no puede transcribirse a partir de este 30 ARNm. La producción de la sustancia P por las 4 variantes de corte y empalme sugiere que cuando se expresa el gen PPT-A, también se produce la sustancia P. La expresión del ARNm α PPT-A se produce predominantemente en el cerebro, mientras que T moléculas de ARNm β PPT-A y γ PPT-A se expresan predominantemente en el tejido periférico.

35 El fragmento 1-37 de PTK-A desempeña una función fundamental en esta invención y se denomina péptido-A en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

40 La sustancia P y otras taquicinas pueden detectarse en diferentes líquidos corporales, tejidos y otros biomateriales.

45 La corta vida media de taquicinas en la sangre, sin embargo, ha impedido hasta el momento la utilización de taquicinas, especialmente de la sustancia P, en el diagnóstico de rutina. Debido a la corta vida media de taquicinas, no es posible en la rutina clínica tomar muestras, obtener el plasma, transportar la muestra al laboratorio y hacer el diagnóstico en el laboratorio, incluyendo las pruebas necesarias antes que la degradación de taquicina alcance un nivel crítico.

50 Por lo tanto debido a la baja estabilidad *in vivo* de las taquicinas como la sustancia P, la utilización como biomarcador está sumamente limitada incluso bajo la logística de muestras optimizadas, ya que la influencia de la degradación de los péptidos diluye extraordinariamente la influencia de la biosíntesis y la liberación de taquicina.

55 El objetivo de la invención consiste en superar la vida media desventajosa de las taquicinas y desarrollar un procedimiento, la utilización y un kit para la detección y determinación de taquicinas en los líquidos corporales, tejidos y otros biomateriales.

60 Este objetivo se consigue por el sorprendente descubrimiento de que protaquicina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones se puede utilizar como una herramienta para la determinación de las taquicinas en los líquidos corporales, tejidos y otros biomateriales, en particular la sustancia P. Esta presencia de la protaquicina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones se correlaciona con la presencia de las taquicinas maduras como la sustancia P en los diferentes líquidos corporales.

65 Además, la estabilidad de protaquicina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones, *ex vivo* es sorprendentemente alta y hace a las protaquicinas totalmente adecuadas para fines rutinarios.

Lo mismo se aplica para la vida media *in vivo* de la protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones que es significativamente más alta que las de la sustancia P, neuroquinina A y neuropéptido K, que las hace adecuadas para ser utilizadas en la detección de la concentración de sustancia P/protaquicinina de y de la velocidad de liberación.

Este enlace entre la protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones de la presente invención y los péptidos maduros los hace adecuados como herramientas de diagnóstico para todas las enfermedades y/o trastornos, donde las proteínas maduras como sustancia P, neuroquinina A, neuropéptido K y neuropéptido γ desempeñan una función.

La protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones por lo tanto se puede utilizar para el diagnóstico de una variedad de enfermedades en la que dicha enfermedad es seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, infecciones bacterianas, meningitis, septicemia, traumatismo y politraumatismo que comprenden traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular y trastornos de la barrera hematoencefálica, enfermedades inflamatorias, neumonía, trastornos cerebrales, cardiopatía coronaria, infección local, hiperalgesia, asma, intoxicación que comprende la intoxicación bacteriana, trastornos inmunitarios, traumatismo craneoencefálico, tumores, accidente cerebrovascular, estrés, dermatitis atópica, VIH, la enfermedad de Huntington, quemaduras, fibromialgia, esquizofrenia, la enfermedad de Hirschsprung, alergias, disautonomía familiar (síndrome de Riley Day), trastornos hematopoyéticos, los gliomas que comprenden los glioblastomas y los astrocitomas.

Además, la presente invención en una forma de realización se refiere a la utilización de la protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones para diagnóstico precoz, diagnóstico del grado de gravedad de la enfermedad, la lucha y pronóstico de la evolución de las enfermedades/trastornos anteriormente mencionados y/o que comprende estas enfermedades/trastornos en los que la proteína madura desempeña una función, y en la que dicha enfermedad es seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, infecciones bacterianas, meningitis, septicemia, traumatismo y politraumatismo que comprenden traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular y trastornos de la barrera hematoencefálica, enfermedades inflamatorias, neumonía, trastornos cerebrales, cardiopatía coronaria, infección local.

Los datos clínicos además pueden tenerse en cuenta para apoyar la determinación de la enfermedad/trastorno.

También se da a conocer la producción de protaquicinina y sus fragmentos.

Los péptidos sintéticos según la presente invención se utilizaron para producir antígenos y se inyectaron en animales para producir anticuerpos contra la protaquicinina. Pueden utilizarse diferentes procedimientos para conseguir este objetivo conocido por los expertos en la materia. En una forma de realización preferida se utilizó hemocianina de *Limulus polyphemus* para la inmunización de conejos.

En una forma de realización preferida de la invención 10 secuencias de aminoácidos (secuencias ID. 1-10) de protaquicininas se sintetizaron, cuatro secuencias de péptidos diferentes más preferidas (PSP1 a PSP4, véase la figura 4a) de protaquicinina se sintetizaron: Los péptidos PSP1 y PSP2 comprenden la secuencia para el péptido A. PSP3 contiene la primera parte de la secuencia de neuropéptido K (NPK) activo y PSP4 comprende también partes de la secuencia de NPK así como Neuropéptido γ (NP γ) y la secuencia completa de neuroquinina A (NKA). Se añadió a cada péptido un resto de cisteína aminoterminal. Los péptidos se conjugaron con una hemocianina de *Limulus polyphemus* y se produjeron anticuerpos contra PSP1 - PSP4 en conejos según procedimientos conocidos.

Se purificaron anticuerpos según procedimientos conocidos, en una forma de realización preferida de la invención, esto se consiguió preferentemente por cromatografía de afinidad específica del ligando acoplado los péptidos con el resto de cisteína amino terminal a SulfoLink-Gel de Pierce (Boston, US) según los procedimientos de Pierce.

En una forma de realización preferida, se marcaron los anticuerpos con un marcador para permitir la detección. El marcador utilizado es preferentemente un marcador luminiscente y en una forma de realización aún más preferida, los anticuerpos contra PSP1 se marcaron con un marcador luminiscente.

La invención todavía en una forma de realización adicional conlleva la utilización de los anticuerpos generados para la detección de protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en líquidos corporales.

Los procedimientos para la detección de la fijación del anticuerpo a la respectiva molécula son también conocidos por los expertos en la materia. En una forma de realización de la invención, la fijación del anticuerpo a la diana (que contiene protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones) se detecta por luminiscencia.

Una forma de realización preferida de la invención da a conocer la utilización de anticuerpos generados contra PSP1 a PSP4: Se utilizaron diferentes combinaciones de anticuerpos (Tabla 1) para la detección de protaquicinina en individuos de referencia, en pacientes con enfermedad de Alzheimer y en pacientes con septicemia en plasma y líquido. Los fragmentos de protaquicinina detectados por los anticuerpos se muestran en la Tabla 1.

La invención permite además la determinación de la presencia y la estabilidad de protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en los líquidos corporales, tejidos y otros biomateriales y la diferencia en protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; la concentración de sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en referencias sanas y pacientes de varias enfermedades.

En una forma de realización, la invención se basa en la estabilidad a largo plazo descubierta de protaquicinina *ex vivo* en el plasma y la utiliza (figura 2). En el plasma la protaquicinina tiene sorprendentemente una vida media de más de 24 h. Cuantas menos peptidasas están presentes en el LCR, es de esperar que la protaquicinina sea incluso más estable en el LCR (líquido cefalorraquídeo) que en el plasma.

Una forma de realización adicional de la invención da a conocer la vida media *in vivo* de PTK/péptido A que es sorprendentemente más de 60 minutos. (figura 3), en comparación con las vidas medias de la sustancia P (1-2 minutos), neuroquinina A (< 2 min.) y neuropéptido K (6 min.).

Por lo tanto la protaquicinina es, con mucho, más adecuada para diagnóstico que las proteínas maduras como la sustancia P.

La invención utiliza además la correlación de protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores y combinaciones y taquicinas maduras, como la sustancia P en el estado de la enfermedad/trastorno en los líquidos corporales, tejidos u otros biomateriales, sangre y líquidos corporales en particular.

En una forma de realización de la invención, se muestra el nivel de inmunorreactividad de protaquicinina con las tres combinaciones de anticuerpos de la tabla 1 de plasma de referencia, septicemia/plasma, la enfermedad de Alzheimer/plasma y líquido de individuos sanos de referencia (véase también el ejemplo 4). Un aumento en la concentración de protaquicinina en el plasma se observa en pacientes enfermos (combinación I de anticuerpos, columna negra) en comparación con el plasma de individuos sanos de referencia (figura 5). La combinación I de anticuerpos detecta el péptido A (fragmento 1-37) y péptidos que contienen péptido A, que está presente en las cuatro variantes de corte y empalme (α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A y δ PPT-A). La combinación II de anticuerpos detecta sólo variantes de corte y empalme α PPT-A y β PPT-A y la combinación III solamente β PPT-A y γ PPT-A. Utilizando la combinación I de anticuerpos, la concentración de péptido A en el plasma de pacientes de septicemia y Alzheimer aumenta significativamente, 2 veces y 12 veces, respectivamente (véase la figura 5). Las combinaciones de anticuerpos II y III también presentan un aumento de 2,5 veces de la concentración de protaquicinina en el plasma de los pacientes de Alzheimer y aproximadamente un aumento de 2,8 veces en el plasma de pacientes de septicemia. En líquidos corporales de individuos sanos de referencia (columnas de la extrema derecha de la figura 5), la combinación I de anticuerpos presenta una señal, las combinaciones de anticuerpos II y III no presentan una señal significativa.

Estos resultados son coherentes con los de la sustancia P en pacientes con Alzheimer, septicemia, embolia cerebral, isquemia cerebral, infección, síntomas dolorosos, trastornos pulmonares y tumores.

La invención da a conocer la concentración de protaquicinina en líquidos corporales, tejidos y otros biomateriales de individuos sanos de referencia y personas enfermas.

En una forma de realización preferida, la invención da a conocer la distribución de las concentraciones de péptidos A en el plasma de individuos sanos (figura 7). El 90% presentan una inmunorreactividad inferior a 35 pg/ml, la mediana fue de 13,3 pg/ml.

La invención da a conocer además un cambio significativo de la concentración de protaquicinina en los líquidos corporales en la enfermedad en la que dicha enfermedad es seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, infecciones bacterianas, meningitis, septicemia, traumatismo y politraumatismo que comprende el traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular, y trastornos de la barrera hematoencefálica, enfermedades inflamatorias, neumonía, trastornos cerebrales, cardiopatía coronaria, infección local.

Una forma de realización preferida de la invención se basa en el sorprendente descubrimiento de un aumento significativo del doble en la concentración de péptido A en pacientes de Alzheimer en comparación con los individuos sanos de referencia de la misma edad, como es consistente con los resultados de la sustancia P. La forma de realización correspondiente de la invención se encuentra en un procedimiento de diagnóstico y kit para analizar muestras corporales, en particular sangre, plasma o líquido corporal con un anticuerpo específico para protaquicinina 1-37 (péptido A), según SEC. ID. nº 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones, sus

precursores o fragmentos, en particular un péptido A.

Una forma de realización preferida adicional de la invención da a conocer un aumento significativo de péptido A que contiene inmunorreactividad en pacientes de neumonía, infección local (abscesos), septicemia, traumatismo y politraumatismos y diversos tumores (figura 10), intoxicación, la inflamación generalizada (figura 11) y el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (figura 9). El líquido corporal de individuos sanos contiene 150 a 450 µg de proteína por ml, 83% de las proteínas se sintetizan en el suero, y sólo 17% en el cerebro. La prostaglandina-D-sintetasa muestra el cociente más alto líquido corporal a suero de 33 determinado hasta ahora. Una forma de realización preferida sorprendentemente demuestra que la inmunorreactividad del péptido A tiene un cociente de suero a líquido corporal de más de 80 y por lo tanto sorprendentemente es significativamente más alto que de otras proteínas. A medida que la concentración de péptido A es mayor en el líquido corporal que en el plasma, un aumento de péptido A en el plasma indica el daño o la pérdida de la función de la barrera hematoencefálica: el líquido corporal se difunde en plasma lo que conduce a un aumento en la concentración de protaquinina en el plasma. La determinación de péptido A o de inmunorreactividad de péptido A es por lo tanto un marcador de plasma potente para el funcionamiento de la barrera hematoencefálica.

Por lo tanto la invención también proporciona un procedimiento de diagnóstico para las enfermedades/trastornos mencionados anteriormente, ambos teniendo o utilizando un anticuerpo para protaquinina 1-37 (péptido A) según SEC. ID. n° 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones.

La invención da a conocer la utilización de protaquinina 1-37 (péptido A) según SEC ID n° 10; sus fragmentos o sus precursores o combinaciones para la detección, la lucha y el pronóstico de la evolución de la enfermedad.

Una forma de realización preferida de la invención determina la concentración de péptido A en la sangre durante la evolución de enfermedades como la meningitis, traumatismo craneoencefálico y apoplejía (hasta convalecencia o fallecimiento) en la figura 9. En un estado enfermo los pacientes presentan un aumento significativo de concentración de péptido A (superior a 35 pg/ml), que disminuye durante la convalecencia, pero se mantiene en constante aumento significativo hasta el fallecimiento del paciente que padece una embolia cerebral.

30 Descripción de las figuras

- Figura 1 presenta la biosíntesis de neuropéptidos *in vivo*.
- Figura 2 presenta la estabilidad de fragmentos de protaquinina *ex vivo* (EDTA-plasma). La vida media de protaquinina a temperatura ambiente es superior a 24 h.
- Figura 3 presenta la determinación de fragmentos de protaquinina *in vivo* después de la aplicación de endotoxina. La vida media de PTK/péptido A es superior a 60 minutos *in vivo*.
- Figura 4 presenta las variantes de corte y empalme de α-PPT-A (AS 1-92, Secuencia ID 1).
- Figura 4b presenta las variantes de corte y empalme de β-PPT-A (AS 1-110, Secuencia ID 2).
- Figura 4c presenta las variantes de corte y empalme de γ-PPT-A (AS 1-95, Secuencia ID 5).
- Figura 4d presenta las variantes de corte y empalme de δ-PPT-A (AS 1-77, Secuencia ID 8).
- Figura 5 presenta reactividad inmunológica de combinaciones de anticuerpos I-III en el plasma de individuos sanos de referencia, pacientes de septicemia, Alzheimer y el líquido corporal de las referencias sanas.
- Figura 6 presenta la curva patrón de luminiscencia (unidades relativas de luminiscencia) en función de las concentraciones de péptido A (pg/ml).
- Figura 7 presenta la curva de distribución de las concentraciones de péptido A en el plasma de individuos sanos de referencia (pg/ml).
- Figura 8 presenta la concentración de péptido A en el plasma de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y las referencias de la misma edad sin demencia.
- Figura 9 presenta la evolución de los pacientes con trastornos cerebrales, que presentan la concentración de péptido A en la embolia cerebral (convalecencia y fallecimiento), la meningitis y el traumatismo craneoencefálico durante la evolución de la enfermedad desde la admisión al hospital hasta 14 días o fallecimiento.
- Figura 10 presenta las concentraciones de péptido A en diferentes enfermedades: neumonía, infección local

(absceso), septicemia, cardiopatía coronaria, traumatismo y politraumatismo o diversos tumores.

Figura 11 presenta la simulación de la inflamación generalizada. Las concentraciones de péptido A, FNT-alfa, IL-6 y PCT después de la aplicación de endotoxina.

5

Ejemplo 1

Producción de Anticuerpos

10 (a) Inmunógeno

Jerini (Berlín, Alemania) seleccionó y sintetizó cuatro secuencias de péptidos diferentes (PSP1 a PSP4), véase la figura 1) de protaquicinina A. Los péptidos PSP 1 y 2 comprenden la secuencia del péptido A. PSP3 comprende la primera parte de la primera secuencia de los neuropéptidos K (NPK) activos y PSP4 también presenta partes de la secuencia de NPK, así como de neuropéptido γ (NP γ) y la secuencia completa de la neuroquinina A (NKA). Cada péptido se proporcionó con un resto de cisteína aminoterminal (Cys0).

15

(b) Anticuerpos

20 Para la inmunización el péptido respectivo se conjugó con la hemocianina de *Limulus polyphemus* por BioGenes (Berlín, Alemania). Se produjeron anticuerpos contra el péptido PTK-conjugado-PSP1 a PSP4 en conejos.

20

Ejemplo 2

25

Purificación de los anticuerpos

Los anticuerpos se purificaron mediante una purificación por afinidad específica de ligandos. Para esta etapa se enlazaron los Cys (0)-péptidos PSP1 a PSP4 a Gel SulfoLink suministrado por Pierce (Boston, EE.UU.). El enlace se efectuó según el protocolo del proveedor.

30

En resumen, las columnas de policarbonato (15 mm x 80 mm) se rellenaron con 5 ml de matriz de afinidad. Después del equilibrado de las columnas con PBS (solución salina tamponada con fosfato) (NaCl 136 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 20,4 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,2) se disolvieron 5 mg del péptido respectivo en PBS aplicado a las columnas cerradas y el material de gel se homogeneizó mediante rotación suave. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente y la sedimentación del material de gel, las columnas se lavaron 5 veces con 3 ml de PBS. Para saturar posiciones de enlace libres se añadieron 5 ml de una solución de L-cisteína 50 mM al material de la columna y el material de gel después de la homogeneización se incubó de nuevo durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la sedimentación del material de gel se lavó cada columna 6 veces con 5 ml de una solución de NaCl 1 M seguido de un lavado con PBS.

35

40

El material de gel se mezcló con 25 ml de los respectivos grupos de antisuero y se incubó durante la noche a temperatura ambiente por rotación suave. La mezcla suero-gel se añade a las columnas de policarbonato y se separó el suero sobrante. Las columnas se lavaron entonces con 250 ml de PBS para eliminar las proteínas de suero no unidas. La desorción de los anticuerpos no unidos se llevó a cabo por elución de la columna con ácido cítrico 50 mM (pH 2,2). El eluido se recogió en fracciones de 1 ml. La concentración de proteína de cada fracción se determinó utilizando el kit de análisis de proteínas BCA de Perbio (Bonn, Alemania) y se combinaron las fracciones con un contenido de proteína > 1 mg/ml. Los anticuerpos purificados por afinidad se volvieron a tamponar en PBS por diálisis. El contenido de proteína se determinó de nuevo y los anticuerpos se almacenaron a 4°C.

45

50

Ejemplo 3

Inmovilización / marcado de los anticuerpos

55 Los anticuerpos purificados contra los péptidos PSP2, 3 y 4 se inmovilizaron en tubos de poliestireno (startubes, 12 mm x 75 mm, Greiner, Alemania). Para este procedimiento las soluciones de anticuerpos se diluyeron a una concentración en proteínas de 6,7 μ g/ml con PBS y se pipetearon 300 μ l por tubo (corresponde a 2 μ g de anticuerpo por tubo). Estos se incubaron durante 20 horas a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con 4 ml de PBS, respectivamente. Los tubos se almacenaron a 4°C hasta nuevo uso. El anticuerpo contra PSP1 (1mg/ml en PBS) se marcó con el marcador luminiscente Acridiniumester-N-hidroxi-succinimida (1 mg/ml en acetonitrilo, In Vent, Hennigsdorf, Alemania). Para el procedimiento de marcado se mezclaron 200 μ l de anticuerpo con 4 μ l de éster de acridinio, se incubó durante 20 minutos y los enlaces de éster de acridinio libre se saturaron mediante la adición de 40 μ l de una solución de glicina 50 mM. El preparado del marcado se separó de éster de acridinio libre por HPLC en una columna de filtración en gel BioSil 400 (BioRad, Munich, Alemania). Se utilizó PBS como disolvente.

60

65

Ejemplo 4

Determinación de la inmunorreactividad de protaquicínina

5 La inmunorreactividad de la protaquicínina se determinó en plasma utilizando tres combinaciones diferentes de anticuerpos de 5 referencias de cada uno, pacientes de septicemia y Alzheimer, así como en el líquido corporal de 5 pacientes de referencia sin demencia. Se pipetearon muestras de 100 µl por tubo recubierto y se añadieron a cada tubo 12,5 ng de los anticuerpos marcados (en 200 µl de tampón de PBS, EDTA 10 mM). Los tubos se incubaron a 4°C durante 20 horas. Posteriormente, anticuerpo trazador no unido se retiró lavando 5 veces con 1 ml de PBS cada una. El anticuerpo unido al tubo se cuantificó detectando la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

15 Los fragmentos de PTK detectados por las diferentes combinaciones de anticuerpos (figura 4a) se muestran en la tabla a continuación y en la figura 4b. Las inmunorreactividades relativas medidas con 3 combinaciones de anticuerpos se muestran en la figura 5. La combinación I de anticuerpos que detecta el péptido A (fragmento 1-37) que está comprendida en las 4 variantes de corte y empalme (αPPT-A, βPPT-A, γPPT-A y δPPT-A). La combinación II de anticuerpos detecta solamente variantes αPPT-A y βPPT-A de corte y empalme y la combinación III solamente βPPT-A y γPPT-A.

20 En el plasma de las referencias, podrían detectarse las secuencias de protaquicínina de pacientes de septicemia y Alzheimer que comprenden las tres combinaciones de anticuerpos. Se calibró al 100% el valor medio de los datos de referencia para la detección de α/β/γ/δ la combinación I de anticuerpos para una mejor comparación entre los resultados y los valores medios de los datos restantes se refirieron a éste (véase la tabla 1). Se demuestra que el péptido A y los fragmentos PTK que comprenden todas las secuencias presentan, con mucho, la mayor concentración en el líquido corporal y presentan una señal 30 veces mayor que en el plasma de las referencias sanas. La inmunorreactividad del péptido A aumentó claramente también en el plasma de pacientes de septicemia. En la presente memoria, la señal es aproximadamente 12 veces mayor que en el plasma de los individuos de referencia. Los pacientes de Alzheimer presentan un aumento de la señal por el factor 2.

30 Las variantes de corte y empalme α/β y α/γ en combinación con las combinaciones II y III de anticuerpos no muestran una señal detectable en líquido corporal. Esto indica que la PTK está presente como la proteína totalmente procesada. En el plasma, sin embargo, pudieron detectarse variantes de corte y empalme α/β y α/γ con las combinaciones II y III, éstas, sin embargo, se ejecutaron a continuación de las señales para α/β/γ/δ (combinación I de anticuerpos).

35 La detección de fragmentos de PTK por la combinación I de anticuerpos que presentan un cociente de 11,6 y 2,0 en las muestras de septicemia y Alzheimer, respectivamente, con relación a las muestras de referencia. El cociente de las muestras de septicemia de las combinaciones de anticuerpos II y III es considerablemente inferior a 11,6 de la combinación I de anticuerpos. Por lo tanto, esta combinación es un método mejor para la diferenciación de las referencias sanas, por lo menos para los pacientes de septicemia. (La elección de combinaciones de anticuerpos no parece ser relevante para la diferenciación de referencias y pacientes de Alzheimer, como el cociente de las muestras de Alzheimer en combinación con todas las tres combinaciones de anticuerpos está en el intervalo de 2.)

Tabla 1: Medición de la inmunorreactividad relativa de fragmentos de PTK en combinación con diferentes combinaciones de anticuerpos

Combinación de anticuerpos	I (PSP2/PSP1)		II (PSP3/PSP1)		III (PSP4/PSP1)	
	α/β/γ/δ		α/β		β/γ	
Fragmentos de PTK detectables	AS 1-37 (α/β/γ/δ)		AS 1-92 (α)		AS 1-89 (β)	
	AS 1-50 (α/β/γ/δ)		AS 1-76 (β)		AS 1-110 (β)	
	AS 1-92 (α)		AS 1-89 (β)		AS 1-74 (γ)	
	AS 1-76 (β)		AS 1-110 (β)		AS 1-95 (γ)	
	AS 1-89 (β)					
	AS 1-110 (β)					
	AS 1-61 (γ)					
	AS 1-74 (γ)					
	AS 1-95 (γ)					
	AS 1-77 (δ)					
Muestra	IR rel.	cociente	IR rel.	cociente	IR rel.	cociente
Muestra de referencia	100	1,0	45,6	1,0	36,4	1,0
Plasma de septicemia	1160	11,6	114	2,5	101	2,8
Plasma de enfermedad de Alzheimer	200	2,0	85,5	1,8	67	1,8
Líquido corporal	3096	30,96	6	0,1	5,5	0,15

IR rel. inmunorreactividad relativa (valores en % en respuesta al valor de plasma de referencia de combinación I de anticuerpos que se calibró al 100%). Todos los valores son valores medios (n = 5).

Cociente relación entre el valor respectivo del paciente (en %) y el valor de referencia correspondiente (en %) de la combinación de anticuerpo respectivo

5 Ejemplo 5

Inmunoanálisis para la determinación cuantitativa de péptido A

1. Componentes

10 En el inmunoanálisis se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpo PSP2 y anticuerpo PSP1 marcados con un marcador luminiscente. La producción de estos componentes se describe en el ejemplo 3.

2. Procedimiento

15 Se pipetearon 100 µl de muestra en cada tubo recubierto con anticuerpo y se añadieron 12,5 ng del anticuerpo marcado (en 200 µl de tampón PBS, EDTA 10 mM). Los tubos se incubaron durante 20 horas a 4°C y, posteriormente, se retiró el anticuerpo trazador lavando 5 veces con 1 ml de PBS. El anticuerpo marcado unido al tubo se cuantificó midiendo la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

3. Calibración

25 Para poder determinar las concentraciones y las inmunorreactividades, de péptido A, Jerini (Berlín, Alemania) sintetizó el péptido. El péptido pesado se utilizó como calibrador para el inmunoanálisis. En la figura 6 se muestra el gráfico patrón del péptido A. La sensibilidad analítica de los análisis del péptido A es de aproximadamente 4 pg/ml.

Ejemplo 6

Concentraciones de péptido A en el plasma de individuos supuestamente sanos (referencias)

30 En la figura 7 se muestra el gráfico de distribución de la concentración de péptido A en el plasma de individuos sanos. El 90% de las 100 muestras de referencia presentan una inmunorreactividad del péptido A inferior a 35 pg/ml. La mediana fue de 13,3 pg/ml.

35 Ejemplo 7

Contenido de péptido en la enfermedad de Alzheimer

40 La inmunorreactividad del péptido A en el plasma de los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y referencias de la misma edad sin demencia difieren significativamente (figura 8). La mediana de las referencias en este caso es 18,0 pg/ml, la mediana de los pacientes de Alzheimer aumenta el doble, es decir, es 39,0 pg/ml.

Ejemplo 8

45 *Concentraciones de péptido A en el líquido cefalorraquídeo (LCR)*

50 Se determinó la concentración de péptido A en el líquido corporal de muestras de referencia (n = 30) y se determinó una mediana de 1085 pg/ml. La mediana de LCR se ha incrementado significativamente por un factor de aproximadamente 80 superior a la mediana del plasma de individuos sanos de referencia.

Ejemplo 9

Concentración de péptido A en disfunciones de la barrera hematoencefálica

55 Se determinó el contenido péptido A en la circulación en la evolución de la enfermedad de pacientes que padecen trastornos cerebrales como la meningitis, traumatismo craneoencefálico, así como embolia cerebral (incluyendo la recuperación o el fallecimiento) (figura 9). Se demostró que la concentración de péptido A era muy alta (superior a la concentración normal de aproximadamente 35 pg/ml) en la admisión de los pacientes al hospital. Los pacientes convalecientes que tienen meningitis, apoplejía o traumatismo craneoencefálico, presentaban una disminución constante de la concentración de péptido A por debajo del nivel normal. Una embolia cerebral con la consiguiente muerte presenta aumento significativo de las concentraciones de péptido A durante el ciclo completo. La concentración de péptido A no disminuye a un nivel normal hasta fallecimiento.

65 Consecuencia: La determinación de la concentración de péptido A puede utilizarse como un marcador de plasma para el funcionamiento de la barrera hematoencefálica. Ya que la concentración de péptido A en líquido corporal es de aproximadamente 80 veces mayor, en comparación con la circulación, la transferencia de proteínas del líquido

corporal en la sangre por la medición de péptido A en el plasma es una señal para una presente distorsión de la función de la barrera hematoencefálica. La evolución de la concentración de péptido A permite una publicación significativa acerca de la enfermedad del paciente y un pronóstico sobre la evolución de la enfermedad.

5 **Ejemplo 10**

Determinación de la concentración de péptido A en la circulación de pacientes que padecen neumonía, infecciones locales, septicemia, enfermedades coronarias del corazón, traumatismo o politraumatismo y diferentes tumores

10 Los pacientes que padecen enfermedades inflamatorias, como la neumonía, infecciones locales (abscesos), así como septicemia, presentaban en partes valores significativamente más altos (> 35 pg/ml) en el 80%, 100% y 72%, respectivamente, de los casos (figura 10). A diferencia de estos resultados sólo 3 de 16 pacientes que padecen cardiopatías coronarias tenían un valor más alto que en las referencias. Los pacientes que padecen de traumatismo y politraumatismo, así como los pacientes que padecen diferentes enfermedades tumorales presentaban un
15 aumento de la concentración péptido A en 50% de los casos en comparación con los individuos de referencia.

Ejemplo 11

Péptido A y simulación de inflamación generalizada

20 El patrón de endotoxina 0113:H10:k de *E. coli* se inyectó por vía intravenosa en personas voluntarias para el ensayo a una concentración de 4 ng/kg de peso corporal. Se tomaron muestras de sangre en diferentes momentos (protocolo según DANDONA *et al.*, 1994). La determinación de diferentes parámetros de inflamaciones (IL-6, FNT α , PCT), así como el péptido A en las personas del ensayo tratadas con endotoxina, presentaba una evolución en
25 función del tiempo de las concentraciones de las sustancias en la sangre (véase la figura 11). En primer lugar, un aumento del FNT después de aproximadamente 1 hora después de la inyección de la endotoxina se produce como se esperaba. Poco después un aumento de citotoxinas IL-6 sigue (alrededor de 1,5 horas después de la inyección de la endotoxina). Después de 3 horas las concentraciones de FNT α e IL-6 están disminuyendo, mientras que ahora, sorprendentemente, se produce un aumento de la concentración de péptido A, que alcanza el nivel de partida
30 después de sólo alrededor de 7 horas. PCT presenta un aumento de la concentración después de 5 horas y aumenta constantemente durante el ciclo posterior. Por lo tanto la secreción de péptido A es inducible por única inyección de endotoxina y es un episodio en la cascada inmunitaria entre FNT α /IL-6 y PCT.

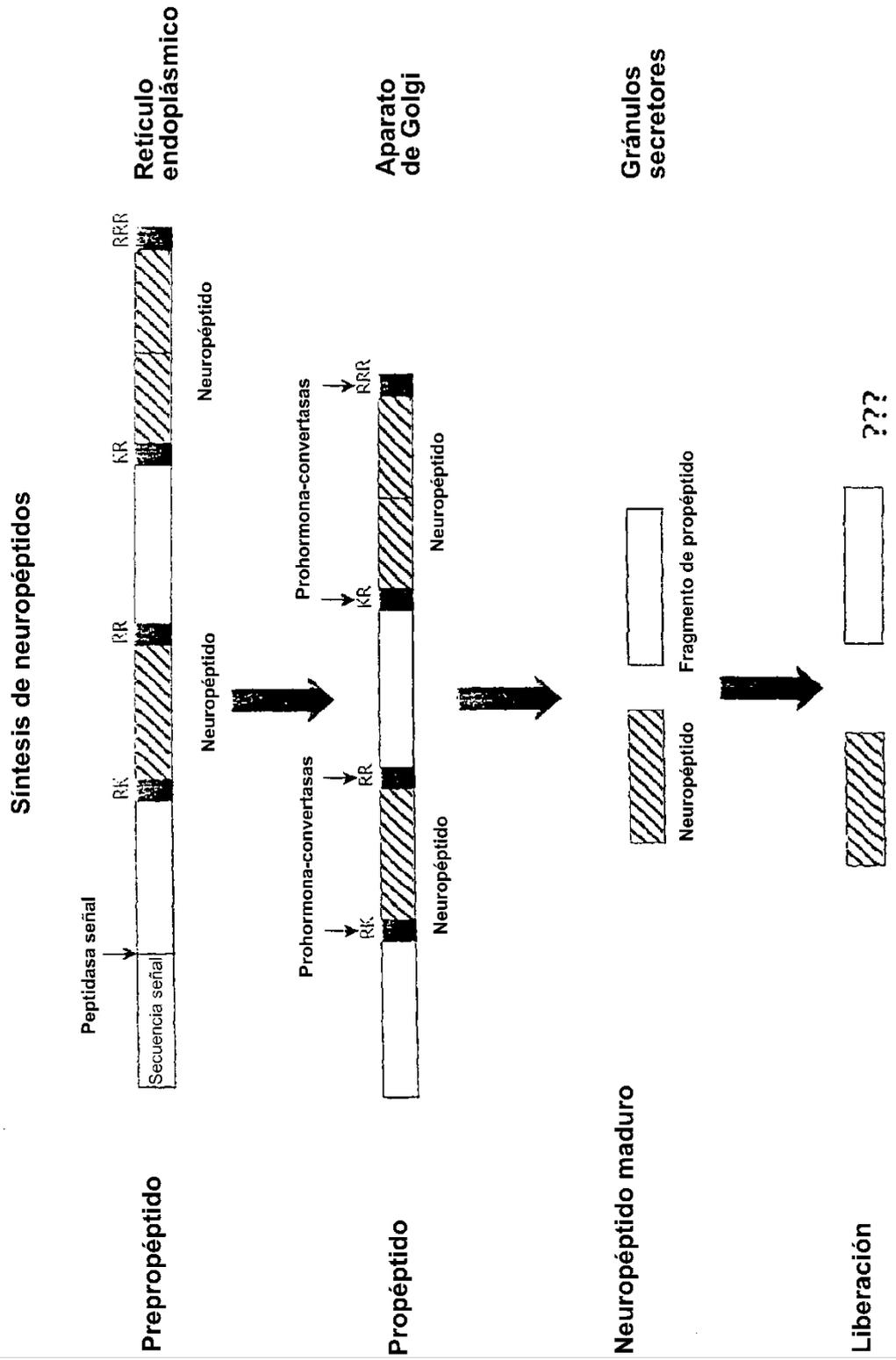
Bibliografía

35 DANDONA P., NIX D., WILSON M. V., ALJADA A., LOVE J., ASSICOT M., BOHJON C., (1994), Procalcitonon increase after endotoxin injection in normal subjects. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 79: 1605-1608.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones para diagnósticos médicos en una enfermedad,
- en la que se determina la presencia o concentración de los componentes mencionados en una muestra de líquido corporal *ex vivo* y
 - en la que dicha utilización implica por lo menos un anticuerpo o combinaciones de anticuerpos que se unen específicamente a la protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10; sus fragmentos, y en la que dicha enfermedad es seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, infecciones bacterianas, meningitis, septicemia, traumatismo y politraumatismo que comprende el traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular, y trastornos de la barrera hematoencefálica, enfermedades inflamatorias, neumonía, trastornos cerebrales, cardiopatía coronaria e infección local.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que se utiliza una variante de corte y empalme seleccionada de entre los ID de secuencia 1, 2, 5 u 8 o una mezcla de dos o más variantes.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1, en la que se utiliza un fragmento seleccionado de entre uno o más de los ID de secuencia 3, 4, 6, 7, 9 o 10.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que se utiliza un derivado de la protaquicinina que comprende aminoácidos alterados o adicionales o fragmentos/componentes aptos para elevar las respuestas inmunitarias o fragmentos/componentes que proporcionan las secuencias aptas para la detección mediante anticuerpos específicos.
- 25 5. Utilización según las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con un marcador, que es apto para detectar cualquier protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones o un compuesto que se une específicamente a la misma.
- 30 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende determinar la concentración de cualquier protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en una muestra de líquido corporal *ex vivo* seleccionada de entre el grupo que comprende sangre, plasma o líquido de un individuo, ser humano o animal.
- 35 7. Utilización según las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho por lo menos un anticuerpo está marcado con un marcador detectable.
- 40 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que el marcador es un marcador luminiscente.
- 45 9. Procedimiento *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad, comprendiendo dicho procedimiento determinar la concentración de protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en líquidos corporales *ex vivo* y en el que dicha enfermedad es seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer, infecciones bacterianas, meningitis, septicemia, traumatismo y politraumatismo que comprende el traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular, y trastornos de la barrera hematoencefálica, enfermedades inflamatorias, neumonía, trastornos cerebrales, cardiopatía coronaria e infección local, comprendiendo dicho procedimiento:
- 50 - utilizar un anticuerpo o combinaciones de anticuerpos que se unen específicamente a la protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o combinaciones,
 - determinar la concentración de protaquicinina 1-37 (péptido A) según SEC ID nº 10, sus fragmentos o sus precursores o combinaciones en la muestra respectiva,
 - 55 - deducir a partir de la concentración la presencia y/o evolución y/o gravedad y/o pronóstico de dicha enfermedad o trastorno,
 - incluir unos datos clínicos adicionales para determinar la presencia y/o evolución y/o gravedad y/o pronóstico de enfermedades o trastornos.
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho líquido corporal es seleccionado de entre el grupo que comprende sangre, plasma o líquido.

FIG. 1



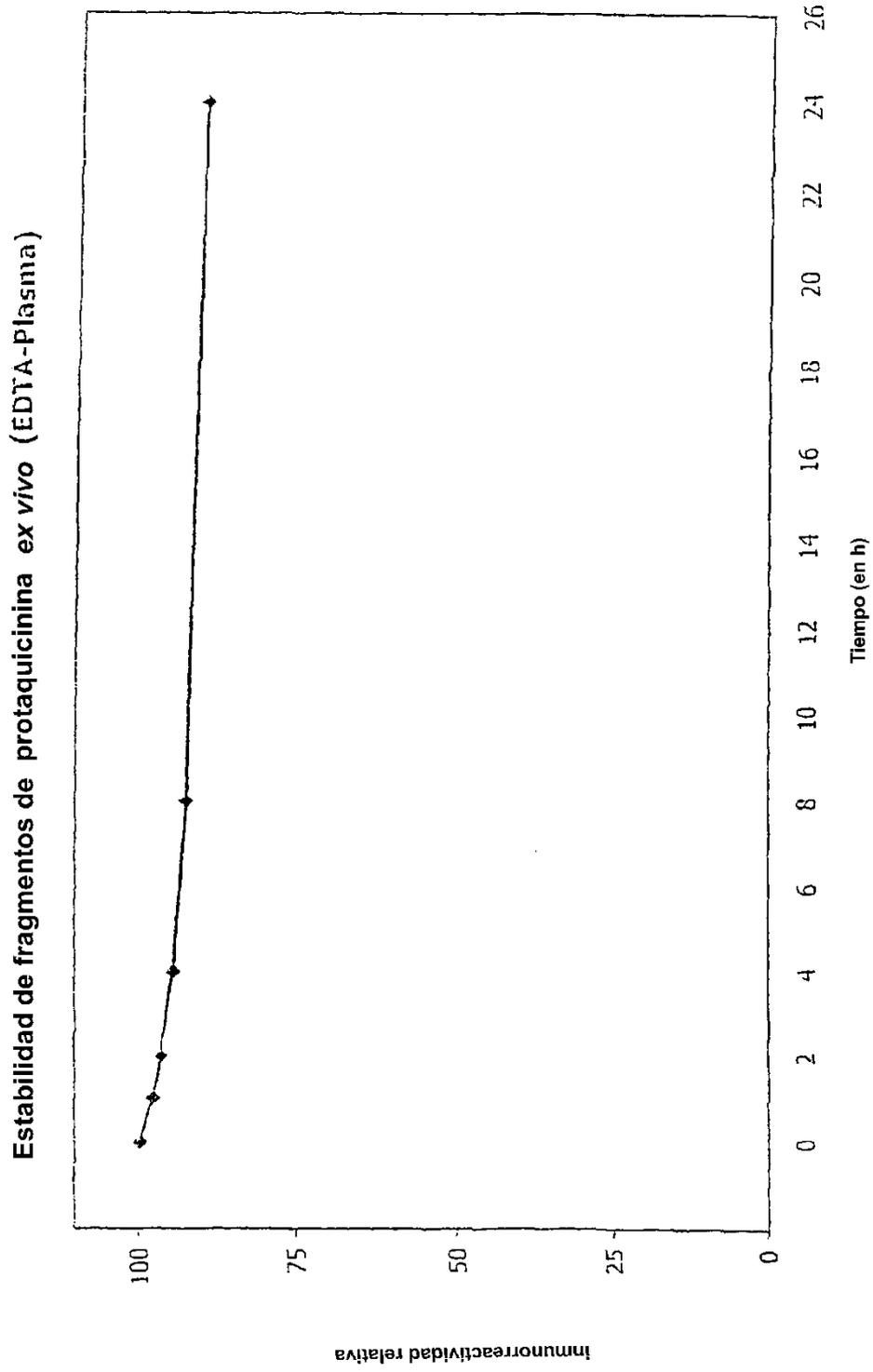
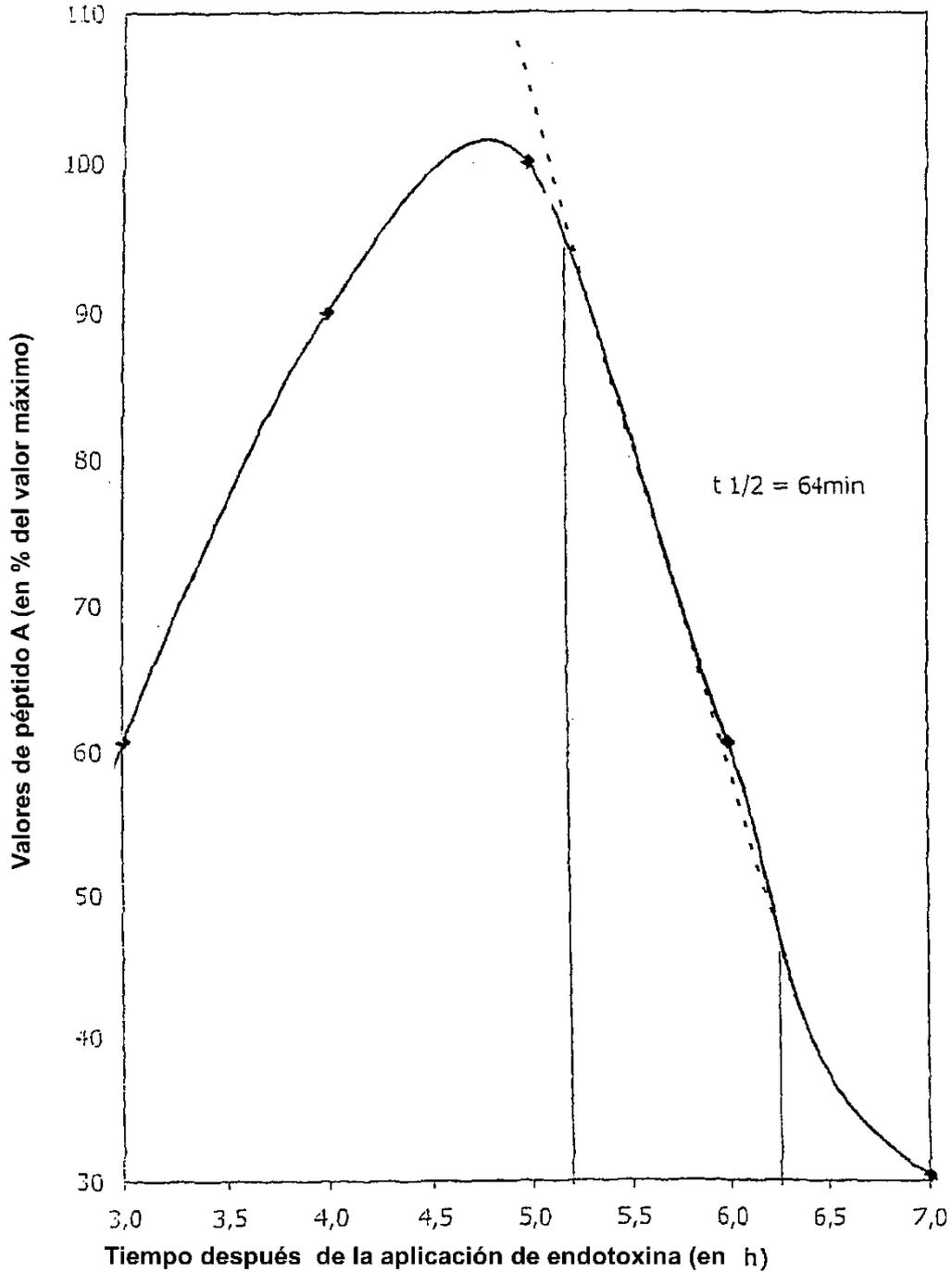


FIG. 2

FIG. 3

Medición de la vida media de fragmentos de FTK que contienen péptido A (*in vivo*)



Uso de valores de péptido A procedentes del estudio con estudio con endotoxina (sólo valores en el intervalo del pico del péptido A)

Pendiente en el intervalo de mayor disminución de concentración

FIG. 4A

Variante de corte y empalme

α PPT-A (AS 1-92, S.-ID 1)

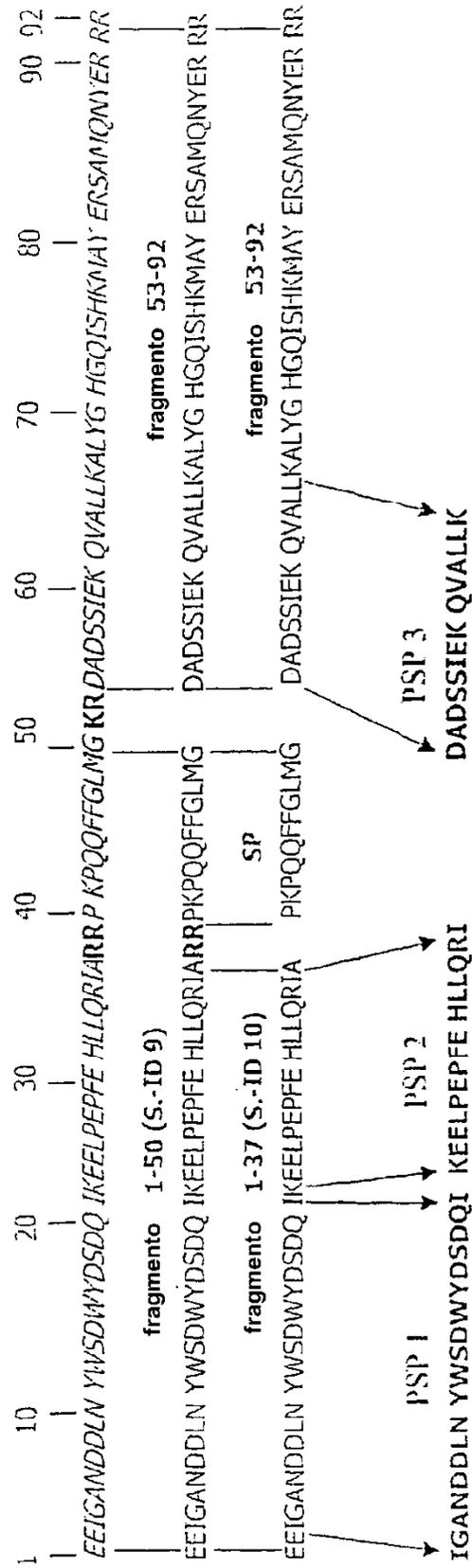


FIG. 4B

Variante de corte y empalme
 ||PPT-A (AS 1-110, S.-ID 2)

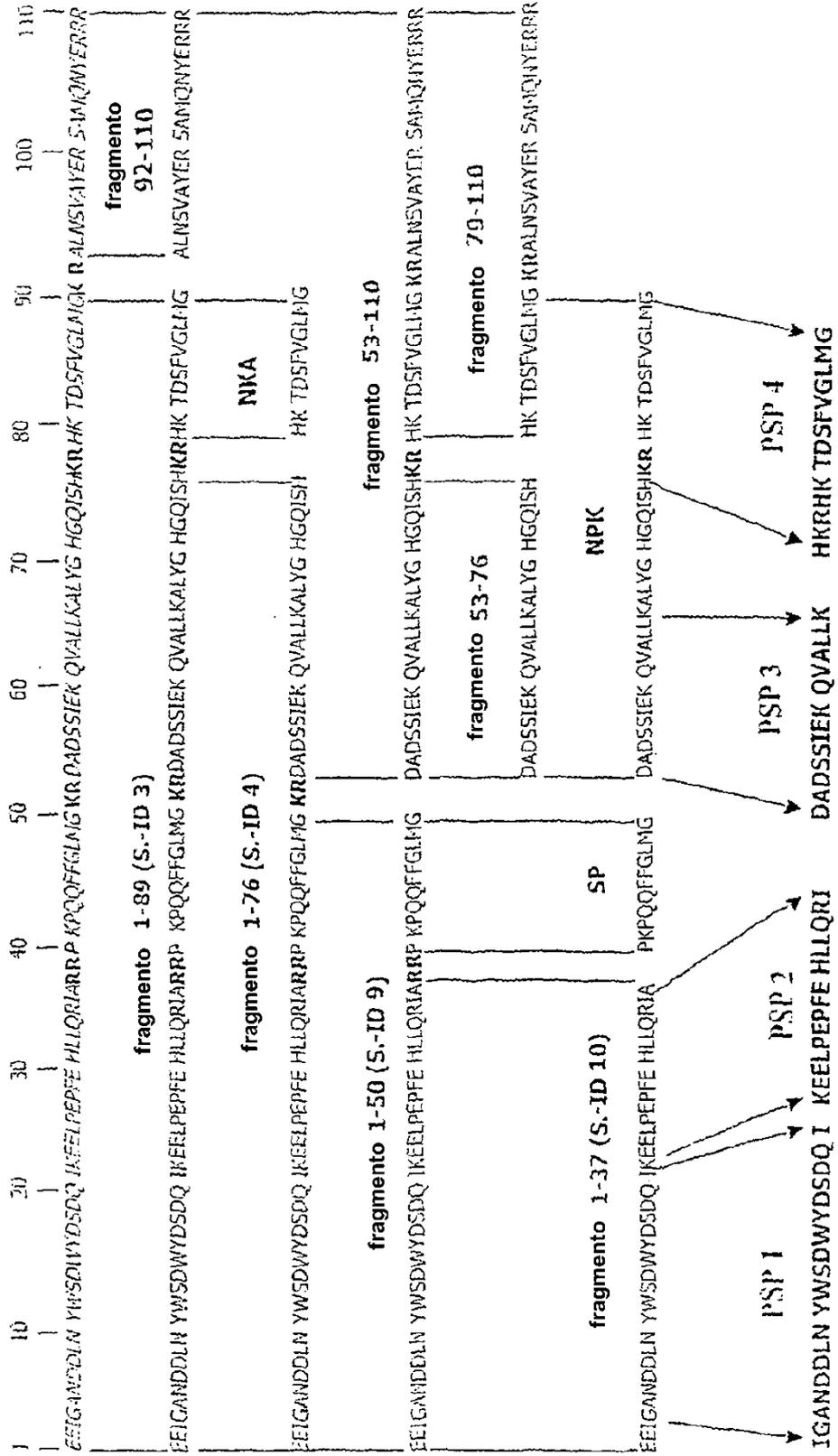


FIG. 4C

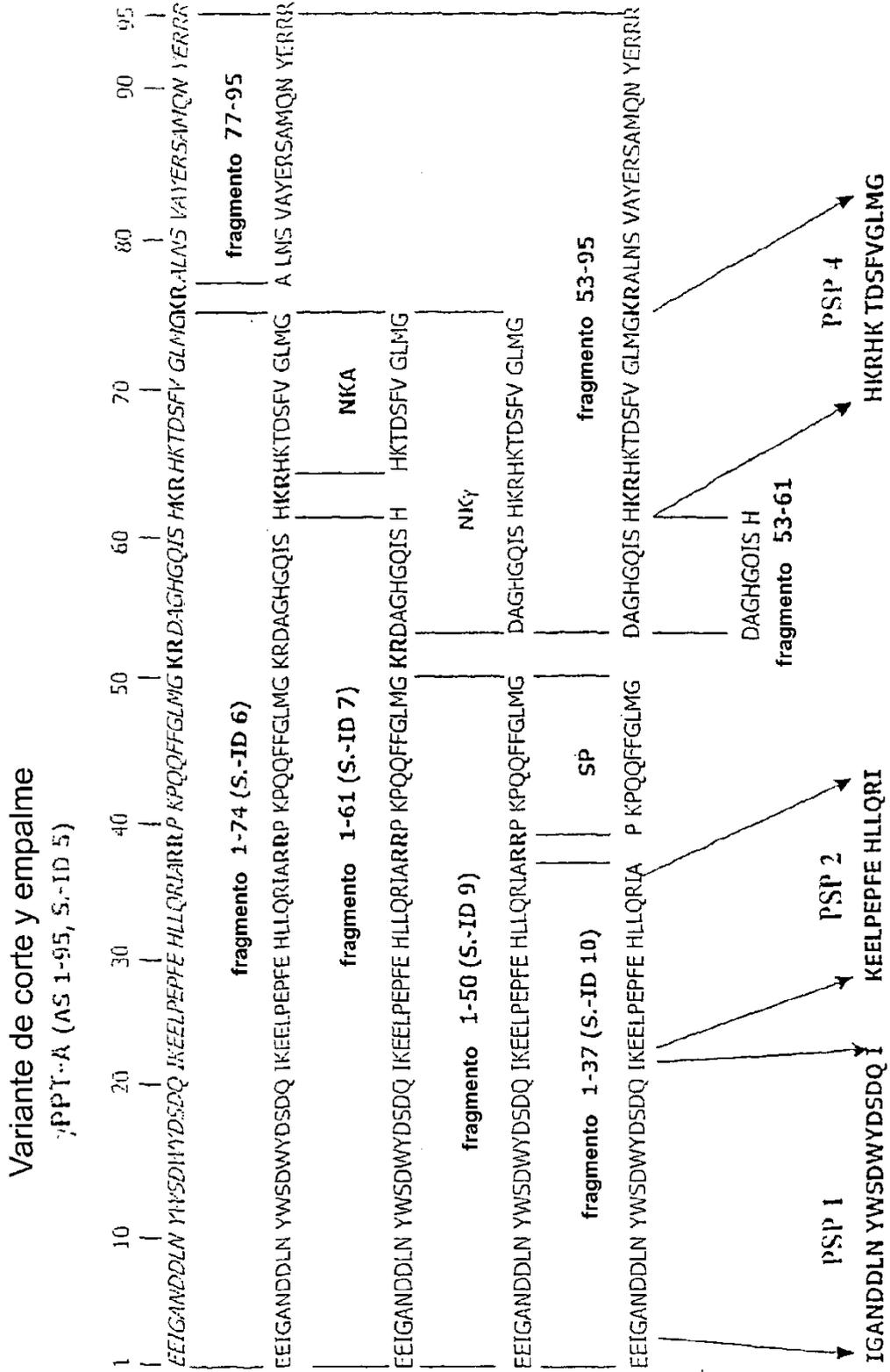


FIG. 4D



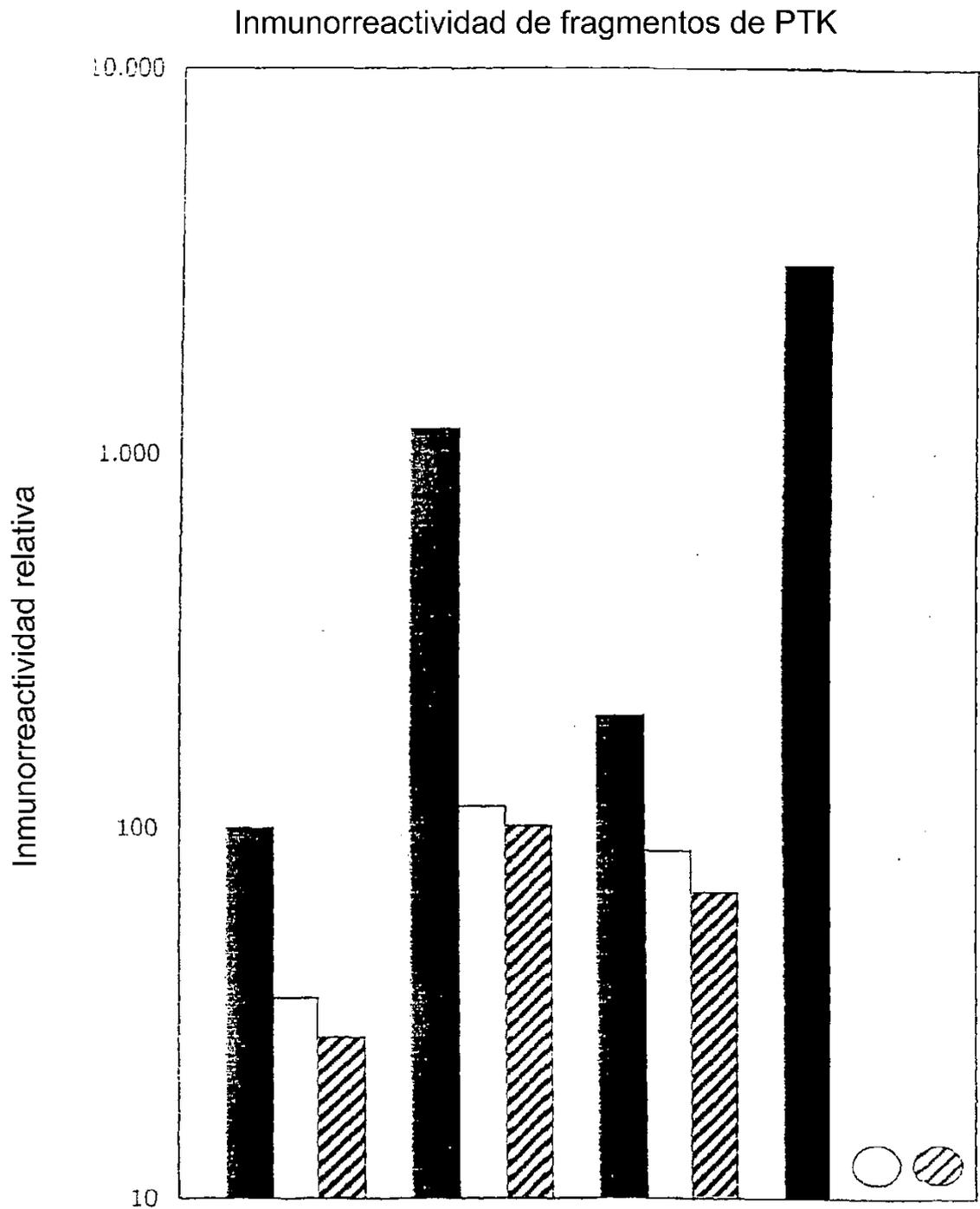


FIG. 5

combinación I de anticuerpos I combinación II de anticuerpos combinación III de anticuerpos
 ... inmunorreactividad relativa << 10
 ... inmunorreactividad relativa << 10

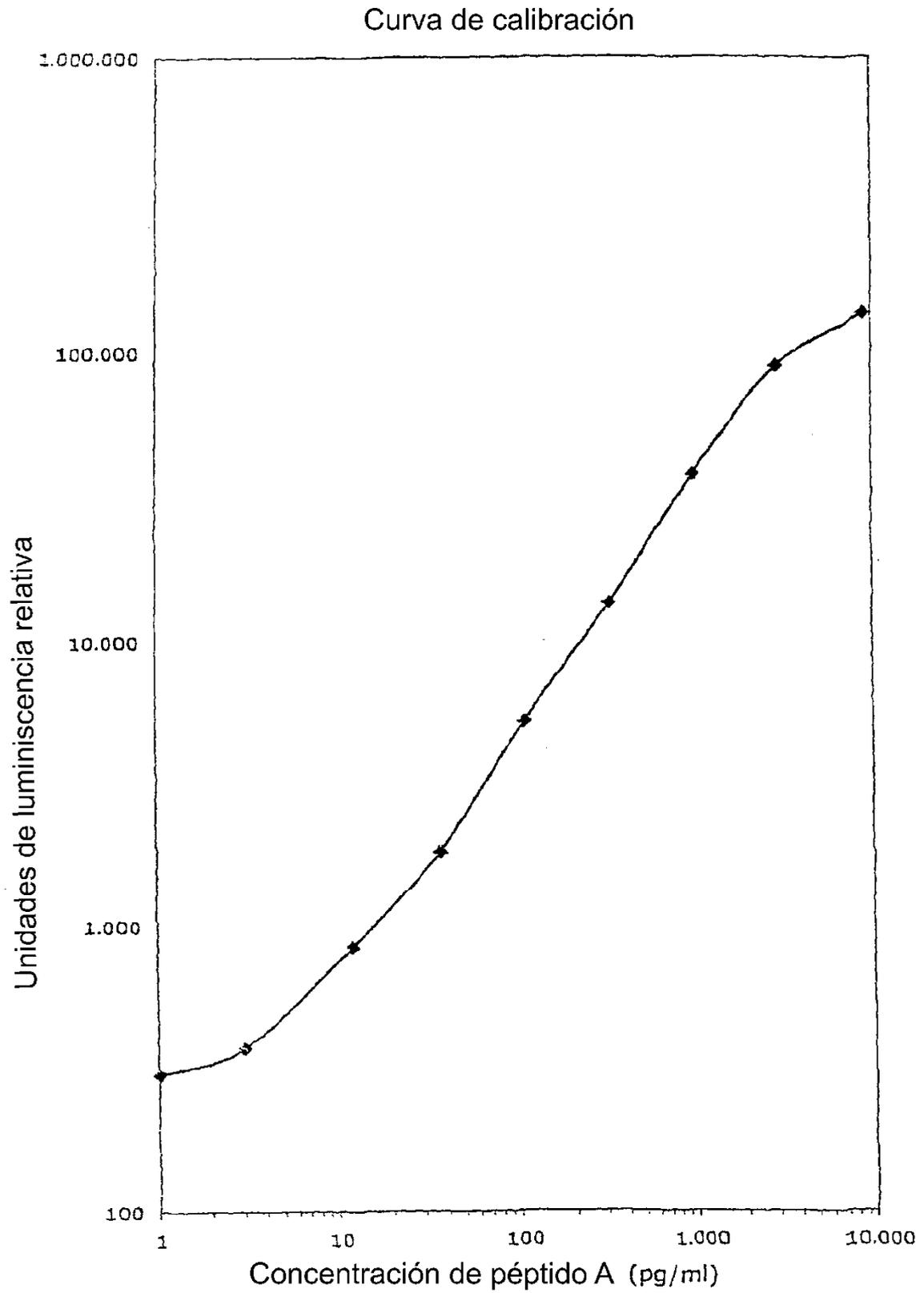


FIG. 6

Distribución de frecuencias de la concentración de péptido A en el plasma de referencias (n = 100)

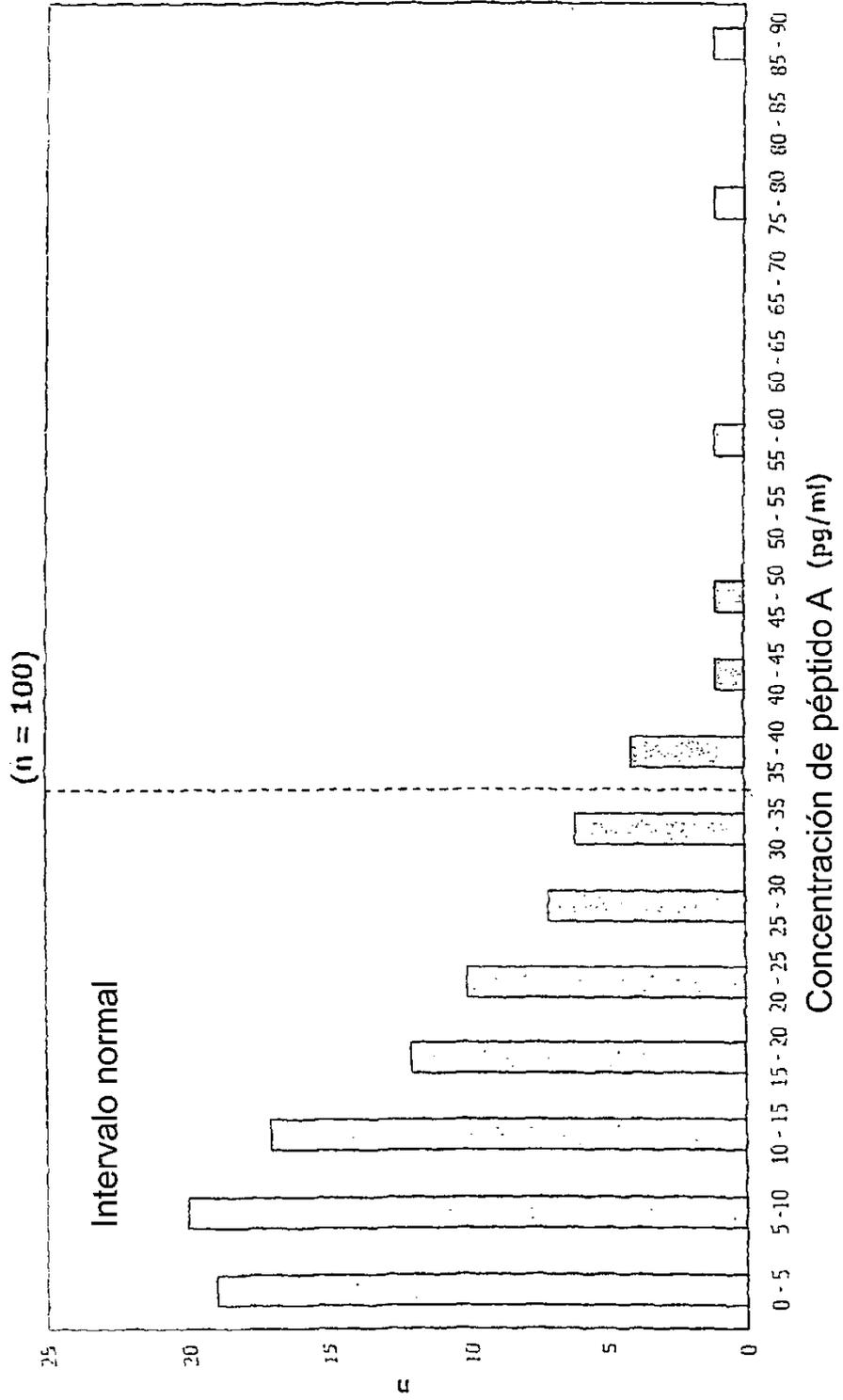


FIG. 7

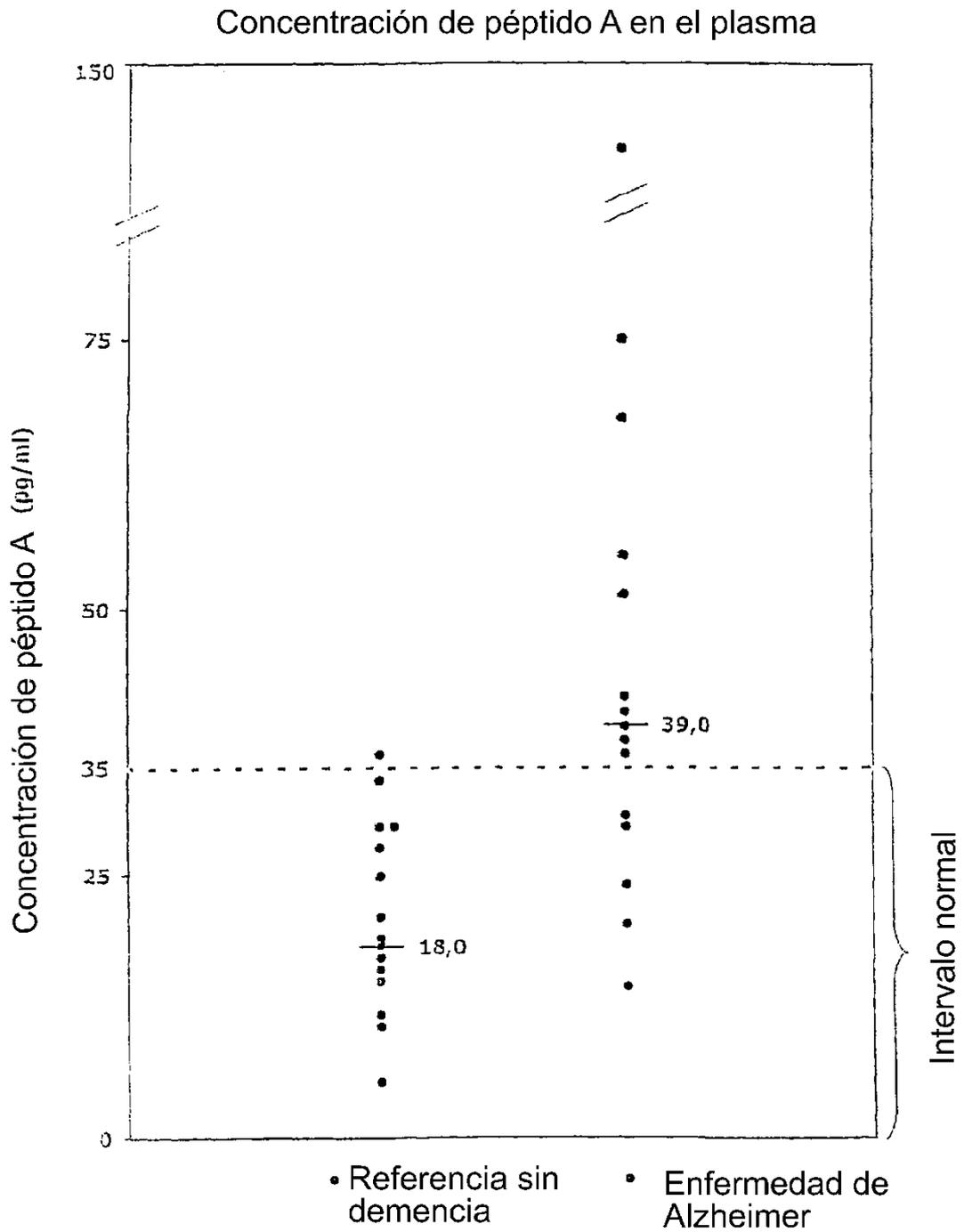


FIG. 8

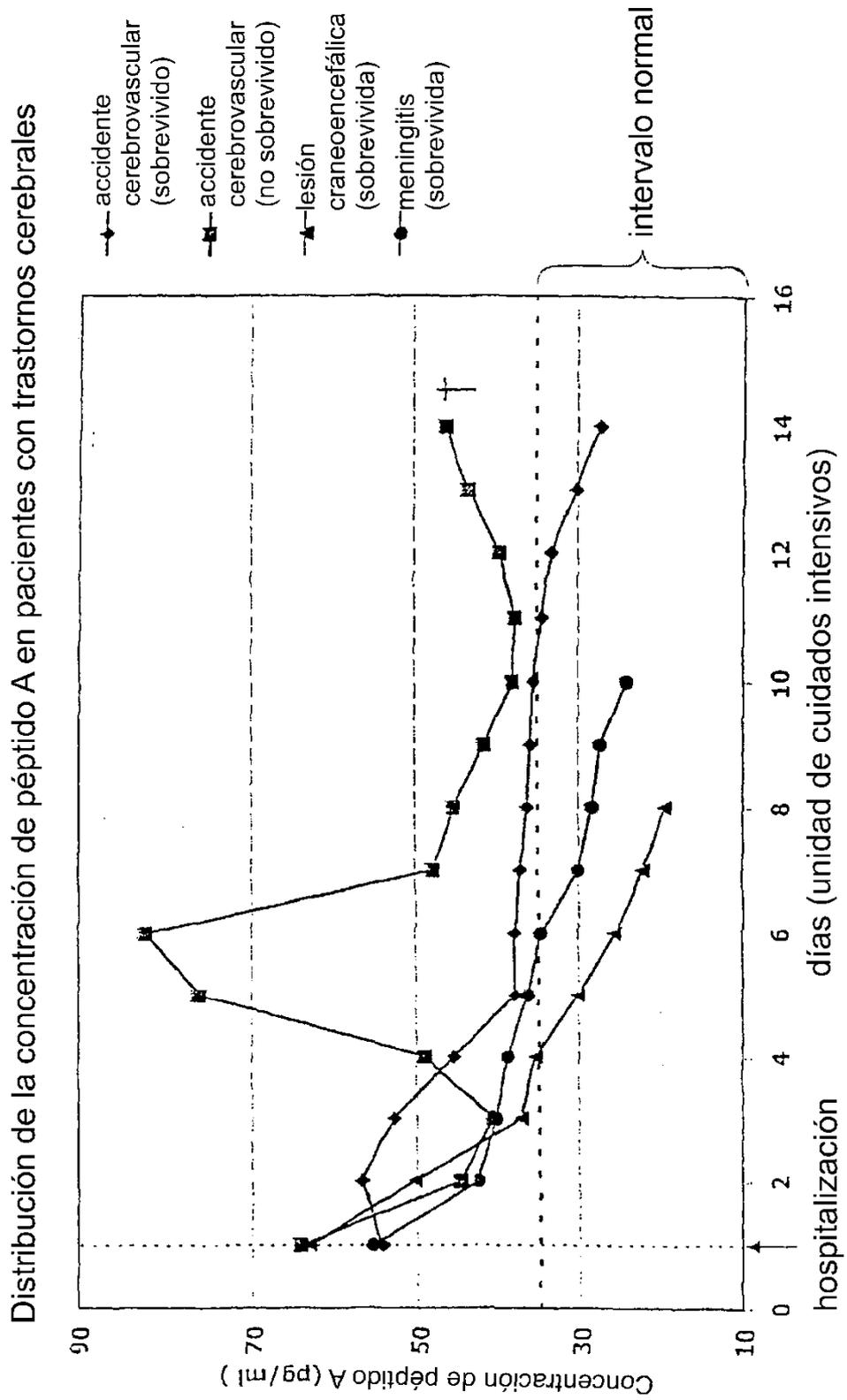


FIG. 9

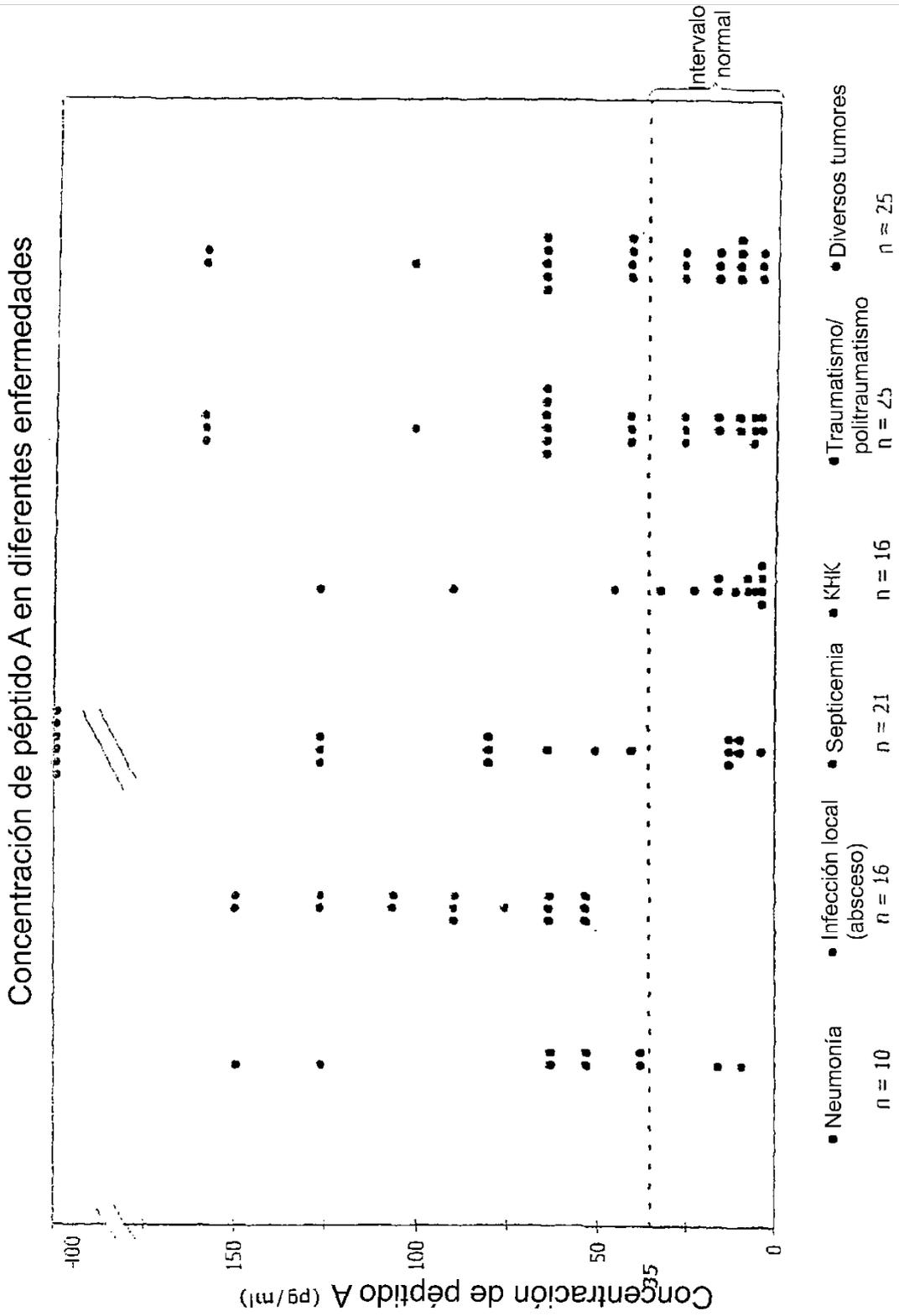


FIG. 10

FIG. 11

