

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 894**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/EP2013/077955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15096858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13815518 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 3087395**

54 Título: **Procedimiento para detectar una inflamación sistémica y sistema de análisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2018

73 Titular/es:
**MEDIAGNOST GESELLSCHAFT FÜR
FORSCHUNG UND HERSTELLUNG VON
DIAGNOSTIKA GMBH (100.0%)
Aspenhastrasse 25
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:
KAUFMANN, INES

74 Agente/Representante:
SALVA FERRER, Joan

ES 2 661 894 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

Procedimiento para detectar una inflamación sistémica y sistema de análisis

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar una inflamación sistémica y al uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica en una muestra aislada de un individuo, así como al uso de una matriz que comprende moléculas de detección para detectar una inflamación sistémica en una muestra aislada de un individuo. La presente invención también se refiere a un procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica. La presente invención se refiere además a progranulina para su uso como biomarcador para una inflamación sistémica.
- 10 [0002] Una inflamación sistémica es una inflamación que afecta a todo el cuerpo.
- 15 [0003] Una inflamación sistémica puede ser causada por la respuesta del sistema inmunitario a una infección grave, más comúnmente bacterias, pero también hongos, virus y parásitos en la sangre, el tracto urinario, los pulmones, la piel, o de otros tejidos de un individuo.
- [0004] Una inflamación sistémica puede continuar incluso después de que la infección que causó la inflamación se supera.
- 20 [0005] Los síntomas comunes de una inflamación sistémica incluyen aquellos relacionados con una infección específica, pero por lo general acompañados por fiebre alta, calor, piel enrojecida, ritmo cardíaco elevado, hiperventilación, estado mental alterado, hinchazón y baja presión arterial. En las personas muy jóvenes y de edad avanzada, o en personas con sistemas inmunes debilitados, el patrón de los síntomas puede ser atípico, con hipotermia y sin una infección fácilmente localizable.
- 25 [0006] Una inflamación sistémica puede tratarse mediante la administración intravenosa de fluidos y antibióticos. Si la reposición de fluidos no es suficiente para mantener la presión arterial, se pueden usar vasopresores. La ventilación mecánica y la diálisis pueden ser necesarios para apoyar la función de los pulmones y los riñones, respectivamente.
- 30 [0007] Las inflamaciones sistémicas incluyen el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o choque séptico.
- [0008] Los criterios para el diagnóstico de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) se estableció en 1992 como parte de la American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Med Crit Care 1992, páginas 864-874; Bone RC et al.: Crit Care Med 1992, páginas 724-726).
- 35 [0009] La conferencia concluyó que las manifestaciones de SIRS incluyen, pero no se limitan a:
- La temperatura corporal de menos de 36°C (96,8°F) o más de 38°C (100,4°F)
 - Ritmo cardíaco mayor que 90 latidos por minuto
 - Taquipnea (frecuencia respiratoria alta), con más de 20 respiraciones por minuto; o, una presión parcial arterial de dióxido de carbono de menos de 4,3 kPa (32 mm Hg)
 - leucocitos de menos de 4000 células/mm³ (4 x 10⁹ células/l) o mayor de 12.000 células/mm³ (12 x 10⁹ células/l); o la presencia de más del 10% de neutrófilos inmaduros (formas de banda).
- 40
- 45 [0010] El SIRS se puede diagnosticar cuando dos o más de estos criterios están presentes.
- [0011] La fiebre y la leucocitosis son características de la reacción de fase aguda. La taquipnea puede estar relacionada con el aumento del estrés metabólico debido a la infección y la inflamación, pero también puede ser una mala señal de perfusión inadecuada que da lugar a la aparición de metabolismo celular anaeróbico.
- 50
- [0012] Como alternativa, cuando se cumplen dos o más de los criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica sin evidencia de infección, los pacientes pueden ser diagnosticados simplemente con "SIRS". Los pacientes con SIRS y disfunción orgánica aguda pueden denominarse "SIRS grave."
- 55
- [0013] La sepsis es una afección en la que los individuos cumplen los criterios de SIRS y tienen una infección conocida o sospechada.
- [0014] La sepsis grave es una sepsis complicada por la disfunción de órganos. El choque séptico es una sepsis complicada por un alto nivel de lactato o por un choque que no mejora después de la reanimación de fluidos.
- 60

- [0015]** Las inflamaciones sistémicas, tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis severa o choque séptico tienen una incidencia mundial de más de 20 millones de casos por año, con una mortalidad debido a choque séptico que alcanza hasta el 50 por ciento, incluso en los países industrializados .
- 5 **[0016]** La tasa de mortalidad de sepsis, por ejemplo, es de aproximadamente 40% en los adultos, y 25% en los niños, y es significativamente mayor cuando se deja sin tratar durante más de 7 días.
- [0017]** Es por tanto un objetivo de la presente invención proporcionar medios que permitan una detección precoz de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 10 **[0018]** El objetivo subyacente de la presente invención se resuelve proporcionando un procedimiento para la detección de una inflamación sistémica que comprende:
a) proporcionar una muestra aislada que se ha tomado de un individuo,
15 b) determinar un nivel patológico de progranulina en dicha muestra aislada.
- [0019]** En una realización preferida del procedimiento para la detección de una inflamación sistémica, dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 20 **[0020]** El nivel de progranulina en dicha muestra aislada se determina preferiblemente mediante procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, análisis de expresión génica, y/o espectroscopia de masas, preferiblemente procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, y/o espectroscopía de masas.
- [0021]** El objetivo de la presente invención se resuelve además mediante un procedimiento de seguimiento del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, que comprende:
- 25 a) proporcionar una primera muestra aislada de un individuo en un primer punto de tiempo,
b) determinar un nivel de progranulina en dicha primera muestra,
c) proporcionar al menos una segunda muestra aislada de dicho individuo en un segundo punto de tiempo, en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a dicho primer punto de tiempo,
30 d) determinar el nivel de progranulina en dicha muestra aislada,
e) comparar el nivel determinado de progranulina en dicha segunda muestra con el nivel de progranulina en dicha primera muestra,
en el que un aumento del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de la progresión de una inflamación sistémica, y/o el empeoramiento de la evolución y/o que el tratamiento es ineficaz, y
35 en el que una disminución del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de la ralentización de la progresión de una inflamación sistémica, y/o la mejora de la evolución y/o que el tratamiento es eficaz.
- 40 **[0022]** En una realización preferida del procedimiento de seguimiento del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 45 **[0023]** En una realización preferida del procedimiento de seguimiento del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, dicho nivel de progranulina en dicha primera muestra y/o dicha segunda muestra se determina mediante procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, análisis de la expresión génica, y/o espectroscopía de masa, preferiblemente procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, y/o espectroscopía de masas.
- [0024]** En una realización preferida del procedimiento de seguimiento del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, dicho segundo de tiempo es entre 15 minutos y 48 horas, preferiblemente entre 30 minutos y 36 horas, preferiblemente entre 45 minutos y 18 horas, preferiblemente entre 1 hora y 24 horas, más tarde que dicho primer punto de tiempo.
- 50 **[0025]** En una realización preferida adicional del procedimiento de seguimiento del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, dicho segundo punto de tiempo es entre 6 horas y 48 horas, preferiblemente entre 12 y 36 horas, preferiblemente entre 18 horas y 24 horas, más tarde que dicho primer punto de tiempo.
- 55 **[0026]** El objetivo de la presente invención se resuelve además mediante el uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica en una muestra aislada de un individuo que comprende:
a) al menos una molécula de detección, que reconoce específicamente progranulina,
60 b) un reactivo para detectar la unión de progranulina a dicha al menos una molécula de detección, y

c) opcionalmente, un soporte sólido que soporta dicha al menos una molécula de detección.

[0027] En una realización preferida adicional del uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica, dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0028] En una realización preferida adicional del uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica, dicha molécula de detección se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo contra progranulina, un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o un elemento estructural adecuado de progranulina, un receptor, que se une específicamente a un epítipo o un elemento estructural adecuado de progranulina, y mezclas de los mismos.

[0029] En una realización preferida adicional del uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica, dicho sistema de análisis está en forma de una matriz, preferiblemente un biochip, una placa de 96 pocillos o similares.

[0030] El objetivo se resuelve también proporcionando un procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una la inflamación sistémica que comprende:

a) proporcionar una muestra aislada de un individuo enfermo de inflamación sistémica y tratado con un compuesto,
 b) determinar el nivel de progranulina en dicha muestra aislada de dicho individuo, y
 c) comparar el nivel determinado de progranulina con uno o más valores de referencia,
 en el que un aumento del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de que el compuesto es ineficaz para el tratamiento de una inflamación sistémica, y en el que una disminución del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de que el compuesto es eficaz para el tratamiento de una inflamación sistémica.

[0031] En una realización preferida del procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica, un individuo enfermo de inflamación sistémica se trata con un compuesto a ensayar.

[0032] En una realización preferida adicional del procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica, dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0033] El objetivo de la presente invención se resuelve además mediante el uso de progranulina como biomarcador para una inflamación sistémica.

[0034] En una realización preferida adicional del uso de progranulina como biomarcador para una inflamación sistémica, dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0035] Otras realizaciones preferidas se especifican en las reivindicaciones dependientes.

[0036] La progranulina es una proteína de 68,5 kDa calculada sobre la base de la secuencia de aminoácidos de progranulina, que consiste en 593 aminoácidos, incluyendo un péptido señal N-terminal de 17 aminoácidos.

[0037] La secuencia de aminoácidos de la progranulina humana está accesible a través de: UniProtKB/Swiss-Prot número de acceso: P28799 o NCBI número de acceso: NP_002078.

[0038] El término "fragmento de progranulina" significa un fragmento de la progranulina de longitud completa, es decir, incluyendo el péptido señal, o de la progranulina madura, es decir, sin péptido señal.

[0039] El término "fragmento de progranulina" significa preferiblemente un fragmento de la progranulina de longitud completa que comprende un tramo de al menos 8 aminoácidos, preferiblemente al menos 18 aminoácidos, preferiblemente al menos 29 aminoácidos, preferiblemente al menos 54 aminoácidos, preferiblemente al menos 68 aminoácidos, preferiblemente al menos 75 aminoácidos, preferiblemente al menos 89 aminoácidos, preferiblemente al menos 105 aminoácidos, más preferiblemente al menos 175 aminoácidos, de la SEQ ID No. 1 o un tramo de al menos 8 aminoácidos, preferiblemente al menos 18 aminoácidos, preferiblemente al menos 29 aminoácidos, preferiblemente al menos 54 aminoácidos, al menos 68 aminoácidos, preferiblemente al menos 75 aminoácidos, preferiblemente al menos 89 aminoácidos, preferiblemente al menos 105 aminoácidos, más preferiblemente al menos 175 aminoácidos, de la SEQ ID No. 1 que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, preferiblemente al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, de identidad con el

tramo respectivo de la secuencia de SEQ ID 1.

5 **[0040]** Preferiblemente, el término "fragmento de progranulina" significa un fragmento de la progranulina de longitud completa que comprende un tramo de aminoácidos no superior a 592 aminoácidos de SEQ ID No. 1 o un tramo homólogo de aminoácidos no superior a 575 aminoácidos de la SEQ ID No 1 que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, preferiblemente al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1.

10 **[0041]** El término "fragmento de progranulina" significa preferiblemente un fragmento de la progranulina madura que comprende un tramo de al menos 8 aminoácidos, preferiblemente al menos 18 aminoácidos, preferiblemente al menos 29 aminoácidos, preferiblemente al menos 54 aminoácidos, al menos ácidos 68 aminoácidos, preferiblemente al menos 75 aminoácidos, preferiblemente al menos 89 aminoácidos, preferiblemente al menos 105 aminoácidos, más preferiblemente al menos 175 aminoácidos, de la SEQ ID No. 2 o un tramo de al menos 8 aminoácidos, preferiblemente al menos 18 aminoácidos, preferiblemente al menos 29 aminoácidos, preferiblemente al menos 54 aminoácidos, al menos 68 aminoácidos, preferiblemente al menos 75 aminoácidos, preferiblemente al menos 89 aminoácidos, preferiblemente al menos 105 aminoácidos, más preferiblemente al menos 175 aminoácidos, de la SEQ ID No. 2 que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, preferiblemente al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, de identidad con el tramo respectivo de la SEQ ID No. 2.

20 **[0042]** Preferiblemente, el término "fragmento de progranulina" significa un fragmento de la progranulina madura que comprende un tramo de aminoácidos no superior a 575 aminoácidos de SEQ ID No. 2 o un tramo homólogo de aminoácidos no superior a 575 aminoácidos de la SEQ ID No. 2 que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, preferiblemente al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, de identidad con la secuencia de SEQ ID 2.

30 **[0043]** Preferiblemente, en los procedimientos de la presente invención y/o el uso de un sistema de análisis de la presente invención y/o el uso de una matriz de la presente invención y/o el uso según la presente invención, el nivel de progranulina en una muestra aislada de dicho paciente se puede detectar adicionalmente en combinación con la detección de un nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en procalcitonina (PCT), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa, proteína C reactiva (CRP), componente P amiloide del suero, amiloide A del suero, factor del complemento, lectina de unión a manano, fibrinógeno, protrombina, factor VIII, factor de con Willebrand, plasminógeno, alfa 2-macroglobulina, ferritina, hepcidina, ceruloplasmina, haptoglobina, alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), alfa 1-antitripsina, alfa 1-antiquimotripsina, albúmina, proteína de unión a retinol, antitrombina, transcortina, fragmento o fragmentos de las mismas, homólogo u homólogos de las mismas y mezclas de las mismas.

35 **[0044]** Según la presente invención, el término "material de muestra" también se designa como "muestra".

40 **[0045]** Según la presente invención, el término "biomarcador" pretende designar una proteína o fragmento de proteína que es indicativo de la incidencia de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

45 **[0046]** Esto significa que el "biomarcador" se utiliza como un medio para detectar una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

50 **[0047]** El término "individuo" o "individuos" tal como se utilizan en la presente solicitud, abarca seres humanos, así como seres no humanos, tales como animales. Preferiblemente, el término "individuo" o "individuos" pretende designar un ser humano, tal como un paciente.

[0048] Los animales se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en roedores, por ejemplo, ratón, rata, hámster, y otros animales, por ejemplo, cobaya, conejo, liebre, perro y cerdo.

55 **[0049]** Estos animales se pueden utilizar para inducir específicamente ciertos estados patológicos, como una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, con fines de investigación. La inducción de dichos estados patológicos puede realizarse, por ejemplo, mediante tratamiento de los animales, por ejemplo, con sustancias radiactivas o biológicas o químicas conocidas para inducir un estado patológico de inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico. Los estados patológicos pueden ser inducidos, por ejemplo, mediante el uso de bacterias, hongos, virus o parásitos. Los estados patológicos también pueden ser inducidos utilizando sistemas de transfección viral. También es posible utilizar animales genéticamente modificados, en los que una o más funciones de un

gen específico han sido alteradas o animales knock-out, tales como ratones knock-out, en los que se ha suprimido una función de un gen específico.

5 **[0050]** Preferiblemente, el término "individuo sano" o "individuos sanos" pretende designar un individuo o individuos no enfermos de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Es decir, el término "individuo o individuos sanos" se utiliza sólo con respecto a la afección patológica de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, y no excluye que el individuo o individuos sufra de enfermedades distintas de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0051] Un individuo sano puede tener un nivel no patológico de progranulina en un material de muestra.

15 **[0052]** Preferiblemente, el término "nivel no patológico" significa designar un nivel máximo de progranulina que no es perjudicial para el individuo.

[0053] Por lo general, un nivel no patológico significa que la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo es menor que o igual a 250 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente menor que o igual a 210 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente menor que o igual a 200 ng por ml de plasma sanguíneo. Preferiblemente, un nivel no patológico significa que la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo está en un intervalo de 10 a 250 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente en un intervalo de de 30 a 210 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente en un intervalo de de 50 a 200 ng por ml de plasma sanguíneo.

25 **[0054]** El valor de referencia para el nivel no patológico puede establecerse como un intervalo a considerar como normal, lo que significa que la persona está sana. El valor de referencia para el nivel no patológico puede calcularse como el nivel promedio de progranulina determinado en muestras aisladas de una pluralidad de individuos sanos, por ejemplo de 100 individuos sanos o más.

30 **[0055]** Preferiblemente, el nivel no patológico promedio significa que la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo es menor que o igual a 250 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente menor que o igual a 210 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente menor que o igual a 200 ng por ml de plasma sanguíneo. Más preferiblemente, el nivel no patológico promedio significa que la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo está en un intervalo de 10 a 250 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente en un intervalo de 30 a 210 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente en un intervalo de 50 a 200 ng por ml de plasma sanguíneo.

35 **[0056]** En casos excepcionales, la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo determinada en una primera muestra de un individuo que no padece el estado patológico de una inflamación sistémica en un primer punto de tiempo podría ser significativamente mayor en comparación con el nivel no patológico promedio. El nivel de progranulina podría ser, por ejemplo 1,5 a 2,5 veces, mayor en comparación con el nivel no patológico promedio, de manera que, por ejemplo, el nivel de progranulina en el plasma sanguíneo podría estar excepcionalmente en el intervalo de 300 a 450 ng por ml de plasma sanguíneo.

40 **[0057]** En este caso, preferiblemente, al menos una segunda muestra aislada de dicho individuo se proporciona en un segundo punto tiempo, en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a dicho primer punto de tiempo, y se determina el nivel de progranulina en dicha al menos una segunda muestra. Un aumento del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de la presencia de una inflamación sistémica.

45 **[0058]** Dado que el nivel de progranulina es en estos casos excepcionales significativamente mayor en comparación con el nivel no patológico promedio, el porcentaje de aumento del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra no es tan fuerte en caso de una inflamación sistémica, en comparación con un porcentaje de aumento basado en un nivel no patológico promedio, tal como se mencionó anteriormente.

50 **[0059]** El porcentaje de aumento puede ser del 20%, preferiblemente del 25%, preferiblemente del 40%, preferiblemente del 60%, preferiblemente del 80%, preferiblemente del 100%, preferiblemente del 120%, preferiblemente del 140%, del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de en progranulina dicha primera muestra en dicho caso excepcional.

60 **[0060]** Una disminución del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es preferiblemente indicativa de la mejora de evolución.

- 5 **[0061]** El término "nivel patológico" pretende designar un nivel de progranulina que es indicativo de la condición patológica de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 10 **[0062]** Por lo general, un nivel patológico significa que la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo es de al menos 240 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 280 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 300 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 320 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 340 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 360 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 375 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 400 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 440 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 450 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente al menos 480 ng por ml de plasma sanguíneo.
- 15 **[0063]** En una realización preferida, un nivel patológico significa que la concentración de progranulina en el plasma sanguíneo es de 120%, preferiblemente 140%, preferiblemente 160%, preferiblemente 180%, preferiblemente 200%, preferiblemente 220%, preferiblemente 240%, de un nivel no patológico, preferiblemente un nivel no patológico promedio.
- 20 **[0064]** El valor de referencia para el nivel patológico puede establecerse como un intervalo a considerar como enfermo, lo que significa que la persona sufre de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. El valor de referencia puede calcularse como el nivel promedio de progranulina determinado en una pluralidad de muestras aisladas de individuos que sufren de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 25 **[0065]** Un aumento del nivel de progranulina puede correlacionarse con la gravedad de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 30 **[0066]** Se ha descubierto sorprendentemente por los presentes inventores que la progranulina puede ser utilizada como biomarcador para la detección de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Los inventores han encontrado ahora sorprendentemente que el nivel de progranulina en un fluido corporal es elevado en individuos que tienen una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Además, el nivel de progranulina en un fluido corporal puede utilizarse para detectar una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, en un individuo.
- 35 **[0067]** La progranulina es una glicoproteína también conocida como proepitelina, acrogranina, factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF), precursor de granulina-epitelina (GEP), glicoproteína de 88 kDa (GP88), factor de crecimiento transformante epitelial (eTGF) o precursor de granulina. Es una proteína de 68,5 kDa, que consiste en 593 aminoácidos, incluyendo un péptido señal N-terminal de 17 aminoácidos, que aparece in vivo en forma fuertemente glicosilada y por lo tanto tiene un tamaño de aproximadamente 90 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS
- 40 **[0068]** La progranulina madura, es decir, sin péptido señal, se designa alternativamente como acrogranina.
- 45 **[0069]** La progranulina se expresa en varios tumores humanos, incluyendo carcinomas (Cuevas-Antonio R, et al.: Cancer Invest 2010, páginas 452-458; Donald CD et al.: Anticancer Res 2001, páginas 3739-3742; Ong CH y Bateman A.: Histol. Histopathol. 2003, páginas 1275-1288), gliomas (Liau LM et al.: Cancer Res. 2000, páginas 1353-1360) y sarcomas (Matsumura N et al.: Clin. Cancer Res. 2006, páginas 1402-1411)
- 50 **[0070]** En el sistema nervioso central (CNS) la progranulina se expresa por microglia y neuronas, incluyendo las células piramidales neocorticales y del hipocampo, así como células de Purkinje en el cerebelo (Daniel R et al.: J. Histochem. Cytochem. 2000, páginas 999- 1009; Matsuwaki T et al.: J. Reprod Dev 2011, páginas 113-119).
- 55 **[0071]** Además, se ha demostrado que una reducción de progranulina conduce a la degeneración lobular frontotemporal (Cruts M y Van Broeckhoven C: Trends Genet 2008, páginas 186-194).
- [0072]** Las concentraciones de progranulina en suero pueden estar asociadas con la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo omental (Youn BS et al.: Diabetes 2009, páginas 627-636).
- 60 **[0073]** También se ha demostrado que la proteinasa 3 y la elastasa de leucocitos neutrófilos mejoran la inflamación en ratones mediante la inactivación de la progranulina anti-inflamatoria (Kessenbrock K et al.: J. Clin Invest 2008, páginas

2438-2447).

[0074] Además, se ha demostrado que tiene lugar una conversión de proepitelina a epitelina en la defensa del huésped y la reparación de heridas (Zhu J et al.: Cell 2002, páginas 867-878).

[0075] También se ha demostrado que la expresión de progranulina en placas ateroscleróticas humanas avanzadas (Kojima Y et al.: Atherosclerosis 2009, páginas 102-108).

[0076] El término "progranulina" tal como se utiliza en la presente invención significa la progranulina humana, que comprende preferiblemente las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No 1 y 2.

[0077] En otra realización preferida, dicha progranulina es un homólogo de la SEQ ID No. 1 o 2 que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, preferiblemente al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1 o 2, respectivamente.

[0078] Varios biomarcadores indicativos para la inflamación sistémica son conocidos en la técnica, tales como la proteína C reactiva, interleuquina-6 o de procalcitonina (Riedel S. y Carroll KC. Clin Lab Med. 2013, páginas 413-37).

[0079] La proteína C reactiva es una proteína de fase aguda sintetizada en el hígado que tiene una vida media biológica de 19 horas. El nivel de proteína C reactiva se determina fácilmente por los sistemas de detección conocidos en la técnica.

[0080] Sin embargo, en el caso de pacientes hospitalizados, especialmente los pacientes que requieren cuidados intensivos, el nivel de proteína C reactiva con frecuencia aumenta. Por lo tanto, la exactitud de predicción de sepsis en estos pacientes se reduce significativamente.

[0081] Además, el nivel de proteína C reactiva en material de muestra de pacientes con diagnóstico de sepsis aumenta relativamente tarde en el desarrollo de sepsis y persiste en niveles elevados durante un periodo más largo de tiempo, tales como días, lo que reduce significativamente las posibilidades de determinar la gravedad de una inflamación sistémica y/o la predicción de la tasa de supervivencia.

[0082] La interleuquina-6 actúa como una citoquina proinflamatoria y una mioquina antiinflamatoria. La interleuquina-6 es secretada por las células T y los macrófagos para estimular la respuesta inmune. La vida media biológica de la interleuquina-6 es de una hora.

[0083] La determinación del nivel de la interleuquina-6 permite un diagnóstico de alta sensibilidad y específico de una inflamación sistémica, especialmente en las primeras etapas.

[0084] Sin embargo, la secreción de interleuquina-6 es regulada por descenso a menudo por una parálisis inmunitaria, una condición en la que el sistema inmunitario no responde. Además, la secreción de interleuquina-6 es suprimida por los esteroides.

[0085] Además, el nivel en plasma de la interleuquina-6 alcanza su nivel máximo en un periodo muy corto y, junto con la vida media biológica relativamente baja de una hora, requiere una determinación precisa del nivel de la interleuquina-6 con el fin de diagnosticar una inflamación sistémica.

[0086] La procalcitonina es un precursor del péptido de la hormona calcitonina. La procalcitonina se compone de 116 aminoácidos y es producida por las células T de la tiroides y por las células neuroendocrinas del pulmón y los intestinos. En el suero, la procalcitonina tiene una vida media de 20 a 24 horas.

[0087] La determinación de los niveles de procalcitonina permite un diagnóstico de una inflamación sistémica con alta especificidad.

[0088] Sin embargo, el aumento del nivel de procalcitonina después de la aparición de una inflamación sistémica se retrasa. Los ensayos para la determinación de procalcitonina son, además, costosos y requieren un largo periodo de observación.

[0089] Se ha descubierto sorprendentemente por los presentes inventores que la progranulina es un biomarcador que permite una detección más rápida de una inflamación sistémica con un aumento de la sensibilidad en comparación con los biomarcadores conocidos.

- 5 [0090] La detección muy temprana de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, mejora significativamente la probabilidad de supervivencia de un individuo enfermo con una inflamación sistémica y es una mejora significativa para el diagnóstico de la inflamación sistémica.
- [0091] El término "progranulina" tal como se utiliza en la presente invención también comprende progranulina truncada, fragmentos de dicha progranulina o progranulina modificada.
- 10 [0092] Las modificaciones en los niveles de proteína pueden ser debidas a modificaciones enzimáticas o químicas dentro del cuerpo. Por ejemplo, la modificación puede ser una glicosilación o fosforilación o metilación.
- [0093] La progranulina tiene siete dominios conservados, que están separadas por secuencias enlazadoras. Por medio de la escisión proteolítica, por ejemplo, catalizada por serina proteasas como, por ejemplo, elastasa, resultan fragmentos que se llaman granulinas o epitelinas.
- 15 [0094] En una realización preferida, dicho fragmento o fragmentos de progranulina comprenden al menos 90%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, preferiblemente al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 1 o 2.
- 20 [0095] La progranulina se expresa y secreta, en particular, en los tejidos fuertemente proliferantes, tales como el tejido adenoide, bazo, epitelio de la piel, membranas mucosas gastrointestinales, células hematopoyéticas y en células tumorales.
- [0096] En una realización preferida de la presente invención, el nivel de progranulina se determina mediante el uso de una molécula de detección seleccionada del grupo que consiste de un anticuerpo contra progranulina, un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, un receptor, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, y mezclas de los mismos.
- 25 [0097] En una realización preferida de la presente invención, dicho receptor puede ser cualquier estructura, preferiblemente proteica, capaz de unirse específicamente a progranulina. El receptor también puede ser un aptámero. Un aptámero puede ser un oligonucleótido de ADN o ARN, que tiene por lo general de 25 a 70 bases, o un aptámero de péptido.
- 30 [0098] En una realización preferida adicional de la presente invención, dicho receptor, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, es un sortilina o un receptor de TNF- α .
- 35 [0099] En una realización preferida de la presente invención, dicho anticuerpo contra progranulina y/o dicho fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, es preferiblemente el anticuerpo monoclonal contra progranulina humana PRT1, que está disponible comercialmente de Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH (Reutlingen, Alemania).
- 40 [0100] En una realización preferida, dicho anticuerpo contra progranulina o dicho fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, es un anticuerpo monoclonal, policlonal o recombinante, o fragmento de anticuerpo.
- 45 [0101] En una realización preferida adicional, dicho anticuerpo contra progranulina o fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, es un anticuerpo modificado, tal como un anticuerpo humanizado, o un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento F(ab')₂.
- 50 [0102] Un anticuerpo adecuado contra progranulina o un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina se podría desarrollar en un roedor, por ejemplo, ratón, rata, hámster, y otro animal, por ejemplo, cobaya, ganado, conejo, liebre, perro, cerdo, cabra u oveja, respectivamente.
- 55 [0103] En una realización preferida adicional de la presente invención, dicho anticuerpo contra progranulina o fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo o a un elemento estructural adecuado de progranulina, detecta la progranulina humana con alta especificidad, preferiblemente que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID No. 1 y 2.
- 60 [0104] De acuerdo con una realización de la presente invención, el fluido corporal se ha aislado antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Los procedimientos de la invención se realizan preferiblemente in vitro por un técnico en un laboratorio o sala de análisis o como una prueba en un punto de atención o pruebas a pie de cama.

- 5 [0105] Preferiblemente, una evaluación rápida del estado patológico o el estado vital de un paciente diagnosticado con una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, puede lograrse mediante la aplicación de los procedimientos de la presente invención en el punto de atención por personal sin formación formal de laboratorio.
- 10 [0106] Preferiblemente, los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo junto con un análisis de glucosa en sangre, un análisis de gases en sangre arterial, un análisis de electrolitos, o una combinación de los mismos, con el fin de evaluar el estado patológico o el estado vital de una paciente diagnosticado con una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 15 [0107] Los procedimientos de la presente invención se realizan con material de muestra, tal como un fluido corporal, que ya se ha aislado del cuerpo humano.
- [0108] El material de muestra puede fraccionarse y/o purificarse. Es, por ejemplo, posible, almacenar el material de muestra a ensayar en un congelador y realizar los procedimientos de la presente invención en un punto apropiado de tiempo después de descongelar el material de muestra respectivo.
- 20 [0109] En una realización preferida, el material de muestra aislado o la muestra aislada es un fluido corporal y se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma sanguíneo, suero, líquido linfático, líquido cerebroespinal (CSF), líquido amniótico, saliva, orina, leche materna y mezclas de los mismos, preferiblemente sangre, plasma sanguíneo, suero y mezclas de los mismos.
- 25 [0110] Según una realización preferida de la invención, se mide un nivel de progranulina en el plasma sanguíneo, suero sanguíneo o líquido cerebroespinal (CSF). Por ejemplo, puede obtenerse fácilmente suero sanguíneo tomando sangre de un individuo a examinar médicamente y separando el sobrenadante de la sangre coagulada.
- 30 [0111] El nivel de progranulina en dicho material de muestra se determina preferiblemente por procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, análisis de la expresión, y/o espectroscopía de masas, preferiblemente procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, y/o espectroscopía de masas. El nivel de progranulina en dicho material de muestra está aumentado.
- 35 [0112] En una realización preferida adicional de la invención, el nivel de progranulina en un material de muestra es significativamente elevado, preferiblemente al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 1,7 veces, preferiblemente al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, preferiblemente al menos 4 veces, aún más preferiblemente al menos 5 veces, aumentado en comparación con el nivel de progranulina en un material de muestra de un individuo que no padece una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico.
- 40 [0113] En una realización preferida de la invención, el nivel de progranulina en una muestra de plasma sanguíneo de un individuo sano es menor o igual a 250 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente menor o igual a 210 ng por ml de plasma sanguíneo, preferiblemente menor o igual a 200 ng por ml de plasma sanguíneo, que se considera que es un nivel no patológico de progranulina.
- 45 [0114] En una realización preferida adicional de la invención, el nivel de progranulina en una muestra se determina por comparación con al menos una muestra de una concentración conocida de progranulina y/o al menos un valor de referencia obtenido a partir de la medición de al menos una muestra de una concentración conocida de progranulina.
- 50 [0115] Preferiblemente, dicho al menos valor de referencia se proporciona como una curva de calibración o como una carta de colores que se obtienen a partir de la medición de diferentes concentraciones de progranulina por ejemplo obtenidas por dilución en serie de una muestra de una concentración conocida de progranulina.
- 55 [0116] En una realización preferida, el nivel de ARNm que codifica progranulina se determina por análisis de la expresión génica utilizando por ejemplo sondas de ácido nucleico capaces de unirse al ARNm que codifica progranulina que está presente en un fluido corporal, tal como suero. Otra realización preferida es producir ADNc mediante transcripción inversa de ARNm de progranulina y detectar específicamente la cantidad de ADNc respectivo. Una cuantificación del ARNm o ADNc medido, respectivamente, puede efectuarse mediante la comparación del valor medido con una curva estándar o de calibración de cantidades conocidas de ARNm o ADNc de progranulina.
- 60 [0117] Preferiblemente, dicha sonda de ácido nucleico puede ser cualquier oligonucleótido de origen natural o sintético, así como ADNc, ARNc y similares, que se une específicamente a ARNm que codifica progranulina.

[0118] El ARNm que codifica progranulina humana está accesible a través de:
NCBI número de acceso: NM_002087.

5 **[0119]** En otra realización preferida, la presente invención permite controlar el nivel de progranulina en un material de muestra aislado o una muestra aislada durante un período prolongado de tiempo, tal como minutos, horas, días o semanas.

10 **[0120]** Dicho período prolongado de tiempo permite un seguimiento del desarrollo individual y/o la progresión de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

15 **[0121]** El seguimiento a largo plazo, tal como, por ejemplo, durante varios días, del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico, durante un período prolongado de tiempo comprende las siguientes etapas:
a) proporcionar una primera muestra aislada de un individuo en un primer punto de tiempo,
b) determinar el nivel de progranulina en dicha primera muestra,
c) proporcionar al menos una segunda muestra aislada del individuo en un segundo punto de tiempo, en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a dicho primer punto de tiempo,
d) determinar el nivel de progranulina en dicha segunda muestra,
e) comparar el nivel determinado de dicha progranulina en la segunda muestra con el nivel de dicha progranulina en la primera muestra.

25 **[0122]** En una realización preferida, la segunda muestra se aísla de dicho individuo en un segundo punto de tiempo apropiado, que es posterior a dicho primer punto de tiempo. Los intervalos se eligen preferiblemente en base de la gravedad de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Los puntos de tiempo de ejemplo pueden ser cada hora o cada día.

30 **[0123]** Un aumento en el nivel de dicha progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de dicha progranulina en dicha primera muestra es indicativo de la progresión de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico, y/o el empeoramiento de la evolución y/o que el tratamiento es ineficaz.

35 **[0124]** Debido al seguimiento a largo plazo del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica, la presente invención, por lo tanto, permite una adaptación del tratamiento de una inflamación sistémica a la gravedad de la inflamación sistémica y/o la causa de la inflamación sistémica.

40 **[0125]** Una disminución en el nivel de dicha progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de dicha progranulina en la primera muestra es indicativo de la ralentización de la progresión de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, sepsis grave o un choque séptico, y/o la mejora de la evolución y/o que el tratamiento es eficaz.

45 **[0126]** El nivel de dicha progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de dicha progranulina en la primera muestra que es esencialmente constante también es indicativo de la ralentización de la progresión de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, sepsis grave o un choque séptico, y/o la mejora de la evolución y/o que el tratamiento es eficaz en el que no hay empeoramiento.

50 **[0127]** El término "epítipo" pretende designar cualquier elemento estructural de una proteína o péptido o cualquier estructura proteica que permite la unión específica de o a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, un aptámero, una estructura de proteína o péptido o un receptor.

55 **[0128]** La presente invención proporciona un biomarcador de etapa temprana que permite detectar una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, en una etapa temprana. La detección precoz permite al médico tratar eficazmente una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, con la medicación disponible, que puede dar lugar a una mejora sintomática temprana.

60 **[0129]** Una mejora sintomática temprana aumenta significativamente las posibilidades de supervivencia de un individuo enfermo con una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0130] Además, la presente invención permite el seguimiento del nivel de progranulina en un fluido corporal, tal como suero sanguíneo, durante un período prolongado de tiempo, tal como semanas.

- 5 **[0131]** El seguimiento a largo plazo del nivel de progranulina permite evaluar la progresión de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. El nivel de progranulina se puede comprobar de forma rutinaria, por ejemplo, todos los días. Si se detecta un aumento del nivel de progranulina, esto puede ser indicativo de una progresión de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, y/o el empeoramiento de la evolución y/o que el tratamiento es ineficaz.
- 10 **[0132]** El seguimiento a largo plazo del nivel de progranulina también permite la detección de una recurrencia de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, después de un tratamiento.
- 15 **[0133]** Además, la evolución de la enfermedad y/o el tratamiento se puede controlar. Si el nivel de progranulina aumenta adicionalmente, por ejemplo después de la medicación, esto puede ser indicativo de exacerbación de la afección patológica.
- 20 **[0134]** Esto significa que el nivel de progranulina es un parámetro clínico valioso para detectar y/o hacer el seguimiento de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 25 **[0135]** El nivel de progranulina en los fluidos corporales podría ser elevado sin la presencia de los síntomas necesarios para el diagnóstico clínico de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Por lo tanto, el nivel de progranulina es un parámetro clínico importante para permitir un diagnóstico precoz y, por consiguiente, un tratamiento precoz de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 30 **[0136]** El procedimiento de la invención para la detección de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, comprende la etapa de proporcionar un material de muestra aislado que se ha tomado de un individuo, a continuación, determinar el nivel de progranulina en el material de muestra aislado, y finalmente comparar el nivel determinado de dicha progranulina con uno o más valores de referencia. En una realización, se detectan adicionalmente uno o más biomarcadores en un material de muestra aislado que se ha tomado de un individuo, el nivel del biomarcador o biomarcadores se determina y se compara con uno o más de los valores de referencia respectivos.
- 35 **[0137]** El valor de referencia puede calcularse como el nivel promedio de progranulina determinado en una pluralidad de muestras aisladas de individuos sanos o individuos que padecen de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Este o estos valores de referencia pueden establecerse como un intervalo a considerar como normal, lo que significa que la persona está sana o padece una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Un valor de umbral dentro de un intervalo puede ser entonces indicativo de las condiciones saludables o el estado patológico de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Puede establecer un intervalo de valores de referencia tomando un número estadísticamente relevante de muestras de fluido corporal, tal como muestras séricas, de individuos sanos como se hace para cualquier otro intervalo de parámetros médicos, tales como, por ejemplo, azúcar en sangre. Preferiblemente, se calculan dos valores de referencia que se designan como control negativo y control positivo 1. El valor de referencia del control negativo se calcula de individuos sanos y el control positivo se calcula de individuos que sufren de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.
- 40 **[0138]** En otra realización de la presente invención, el valor o valores de referencia pueden ser un valor o valores de referencia individuales calculados como el nivel promedio de progranulina determinado en una pluralidad de muestras aisladas tomadas del individuo durante un periodo de tiempo.
- 45 **[0139]** Cuando se controla el nivel de progranulina durante un periodo prolongado de tiempo, tales como horas, días o semanas, es posible establecer un nivel promedio individual. El nivel de progranulina se puede medir, por ejemplo, a partir de la misma muestra de suero sanguíneo cuando se mide el azúcar en sangre y puede ser utilizado para detectar específicamente cualquier aumento individual del nivel de progranulina.
- 50 **[0140]** La presente invención es particularmente útil en términos de la medicina personalizada.
- 55 **[0141]** El valor o valores de referencia para biomarcadores adicionales también puede calcularse de la misma manera que
- 60

se describe para el nivel de progranulina. El nivel o niveles promedio de biomarcadores adicionales a progranulina puede ser la media o la mediana del nivel.

5 **[0142]** Otro aspecto de la presente invención es el uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, en un material de muestra aislado de un individuo, que comprende:

- a) al menos una molécula de detección, que reconoce específicamente progranulina,
- b) un reactivo para detectar la unión de progranulina a dicha al menos una molécula de detección, y
- 10 c) opcionalmente, un soporte sólido que soporta dicha al menos una molécula de detección.

[0143] En una realización preferida, dicha al menos una molécula de detección está unida a dicho soporte sólido, tal como, por ejemplo, una superficie, en particular de plástico, o esferas para permitir la unión y detección de progranulina. Por ejemplo, una placa de microtitulación convencional puede utilizarse como una superficie de plástico.

15 **[0144]** La detección de la unión de al menos una molécula de detección puede efectuarse, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado con un grupo detectable. El grupo detectable puede ser, por ejemplo, un isótopo radiactivo o una enzima como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina detectable añadiendo un sustrato adecuado para producir, por ejemplo, un color o una señal de fluorescencia.

20 **[0145]** El sistema de análisis a utilizar puede ser un inmunoensayo, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo de luminiscencia (LIA). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro sistema de ensayo inmunológico usando la especificidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o receptores, tal como transferencia Western o inmunoprecipitación o citometría de flujo.

25 **[0146]** En una realización preferida, el sistema de análisis a utilizar puede ser un ensayo de análisis de expresión génica que comprende, por ejemplo, sondas de ácido nucleico capaces de unirse a ARNm que codifica progranulina que está presente en un fluido corporal, tal como suero. Otra realización preferida es producir ADNc por transcripción inversa de ARNm de progranulina y detectar específicamente la cantidad de ADNc respectivo con dicho sistema de análisis. Una cuantificación del ARNm o ADNc medido, respectivamente, puede efectuarse mediante la comparación del valor medido con una curva estándar o de calibración de cantidades conocidas de ARNm o ADNc de progranulina.

[0147] Preferiblemente, dicha sonda de ácido nucleico puede ser cualquier oligonucleótido de origen natural o sintético, así como ADNc, ARNc y similares, que se una específicamente a ARNm que codifica progranulina.

35 **[0148]** El sistema de análisis a utilizar puede ser diseñado como una matriz que comprende moléculas de detección para detectar una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, en un individuo, en el que la molécula de detección puede ser:
 - un anticuerpo o fragmento de anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de un epítipo de progranulina, o
 40 - un receptor inmovilizado sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de progranulina, o
 - una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido para la unión a ARNm que codifica progranulina.

[0149] En una realización preferida del sistema de análisis a utilizar, dicha matriz comprende al menos un anticuerpo contra progranulina y/o al menos un fragmento de anticuerpo, que reconoce específicamente progranulina, que se inmoviliza sobre un soporte sólido y específicamente reconoce y se une a progranulina, en dicha muestra aislada.

[0150] La molécula de detección puede ser un anticuerpo contra progranulina y/o al menos un fragmento de anticuerpo, que reconoce específicamente la progranulina a la que está acoplada un resto detectable, tal como un colorante, preferiblemente fluorescencia, enzima, etc.

50 **[0151]** Es evidente que hay varias posibilidades utilizando anticuerpos primarios y, si es necesario o apropiado, secundarios y/o fragmentos de anticuerpo para producir un sistema de ensayo inmunológico.

[0152] Preferiblemente, la matriz comprende más moléculas de detección que son biomarcadores para detectar una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0153] El término "inmovilizado" tal como se utiliza en la presente invención pretende designar la unión, directa o indirecta, a través de al menos una molécula enlazadora o espaciador, a un soporte sólido.

60 **[0154]** Por ejemplo, la inmovilización indirecta puede realizarse mediante el uso de un oligonucleótido sintético, tal como

un aptámero. Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios que asumen una forma específica, dependiente de la secuencia y se unen a dianas proteicas con elevada especificidad y afinidad. Los aptámeros se identifican usando el proceso SELEX (Tuerk C. and Gold L. (1990) Science 249: 505-510; Ellington AD y Szostak JW (1990) Nature 346: 818-822).

5

[0155] Alternativamente, la presente invención también comprende una matriz inversa que comprende muestras del paciente inmovilizadas sobre un soporte sólido que pueden ser detectadas por las moléculas de detección definidas anteriormente.

10 **[0156]** Preferiblemente, la matriz comprende moléculas de detección que se inmovilizan sobre una superficie sólida en posiciones identificables.

15 **[0157]** El término "matriz" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una agrupación o una disposición del sistema de análisis, sin ser necesariamente una disposición regular. Una matriz comprende preferiblemente al menos 2 o más conjuntos de moléculas de detección definidas anteriormente o muestras de individuos a analizar. Preferiblemente, la matriz comprende al menos 50 o más conjuntos de moléculas de detección o muestras de individuos a analizar, más preferiblemente al menos 100 o más conjuntos de moléculas de detección o muestras de individuos a analizar. Preferiblemente, la matriz comprende al menos 500 o más conjuntos de moléculas de detección definidas anteriormente o muestras de individuos a analizar.

20

[0158] Preferiblemente, la matriz puede ser una micromatriz o una macromatriz.

25 **[0159]** En una realización preferida, las moléculas de detección definidas anteriormente se inmovilizan en una superficie o soporte sólido o superficie de soporte sólido. Esta matriz o micromatriz se criba a continuación por contacto de la matriz con sondas proteicas preparadas a partir de muestras de individuos a analizar.

30 **[0160]** En otra realización preferida, las sondas proteicas preparadas a partir de muestras de individuos a analizar se inmovilizan en una superficie o soporte sólido o superficie de soporte sólido. Esta matriz o micromatriz se criba a continuación por contacto de la matriz con las moléculas de detección definidas anteriormente.

35

[0161] El soporte puede ser un material polimérico, tal como nylon o plástico, o un material inorgánico, tal como silicio, por ejemplo una oblea de silicio, o cerámico. Según una realización preferida, se utiliza vidrio (SiO₂) como material de soporte sólido. El vidrio puede ser un portaobjetos de vidrio o un chip de vidrio. Según otra realización de la invención, el sustrato de vidrio tiene una superficie atómicamente plana.

40

[0162] Por ejemplo, la matriz puede estar compuesta de:

- un anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de un epítipo de progranulina, o
- un receptor inmovilizado sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de un epítipo de progranulina, o
- 40 - una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de ARNm que codifica progranulina.

45 **[0163]** Preferiblemente, se inmovilizan diferentes cantidades de moléculas de detección cada una sobre el soporte sólido para permitir una cuantificación precisa del nivel de progranulina.

50

[0164] Según otra realización de la invención, el nivel de progranulina se determina por espectroscopía de masas.

[0165] La espectroscopía de masas permite detectar específicamente el nivel de progranulina muy fácilmente.

55 **[0166]** Cualquier procedimiento de ionización adecuado en el campo de espectroscopía de masas conocido en la técnica se puede emplear para ionizar la progranulina. Los procedimientos de ionización comprenden impacto electrónico (EI), ionización química (CI), ionización de campo (FDI), ionización por electrospray (ESI), ionización por desorción láser (LDI), desorción e ionización por láser asistida por matriz de (MALDI) y desorción e ionización por láser mejorada en la superficie (SELDI).

60

[0167] Cualquier procedimiento de detección adecuado en el campo de espectroscopía de masas conocido en la técnica se puede emplear para determinar la masa molecular de progranulina. Los procedimientos de detección comprenden espectroscopía de masas de cuadrupolo (QMS), espectroscopía de masas con transformada de Fourier (FT-MS) y espectroscopía de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS).

[0168] En una realización de la presente invención, la sensibilidad y/o especificidad de la detección de una inflamación

5 sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, se ven reforzadas mediante la detección adicional de un nivel de un biomarcador adicional. En particular, en una realización, la sensibilidad y/o especificidad de la detección de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, se ven reforzadas mediante la detección de un nivel de otra proteína en combinación con el nivel de progranulina.

[0169] Preferiblemente, la sensibilidad y especificidad de los procedimientos, matrices, sistemas de ensayo y usos de acuerdo con la presente invención se incrementan mediante la combinación de detectar el nivel de progranulina.

10 [0170] La sensibilidad y especificidad se definen de la siguiente manera:
La sensibilidad es la cantidad de pacientes positivos verdaderos (%) con respecto al número de todos los pacientes (100%). Los pacientes son individuos que tienen una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

15 [0171] La especificidad es el número de individuos negativos verdaderos (%) con respecto al número de todos los individuos sanos (100%).

[0172] La sensibilidad y especificidad pueden definirse alternativamente por las siguientes fórmulas:

		diagnóstico	
		+	-
prueba	+	TP	FP
	-	FN	TN

20 TP: Verdaderos positivos (prueba positiva, diagnóstico correcto);
FP: Falsos positivos (prueba positiva, diagnóstico incorrecto);
TP: Verdaderos negativos (prueba negativa, diagnóstico correcto);
FP: Falsos negativos (prueba negativa, diagnóstico incorrecto);

25 [0173] La sensibilidad se calcula por la siguiente fórmula:

$$TP/(TP + FN)$$

30 y la especificidad se calcula por la siguiente fórmula:

$$TN/(TN + FP)$$

35 [0174] El resultado de cada grupo de análisis, que se selecciona entre TP, FP, TN, FN, se calcula para una pluralidad de muestras aisladas seleccionadas del grupo que consiste en individuos sanos, pacientes que sufren de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. TP, FP, TN, FN se refieren al número de individuos que se correlacionan con el estado verdadero positivo, falso positivo, verdadero negativo, falso negativo, respectivamente.

40 [0175] Los procedimientos de la presente invención pueden llevarse a cabo en combinación con otros procedimientos de diagnóstico para la detección de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, para aumentar la sensibilidad y/o especificidad global.

45 [0176] La detección del nivel de progranulina permite una detección muy temprana de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, y por lo tanto se puede utilizar como un marcador muy temprano.

50 [0177] Preferiblemente, los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo como un procedimiento de detección precoz y/o procedimiento de seguimiento. Si los resultados de los procedimientos de la presente invención indican la incidencia de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, deben llevarse a cabo más exámenes, en particular, evaluaciones deseadas.

55 [0178] La presente invención proporciona además un procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico.

[0179] El procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica,

especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra aislada de un individuo enfermo de inflamación sistémica y tratado con un compuesto,
- b) determinar el nivel de progranulina en dicha muestra aislada de dicho individuo, y
- c) comparar el nivel determinado de progranulina con uno o más valores de referencia.

[0180] En otra realización, el procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, comprende las etapas de:

- a) tratar un individuo enfermo de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico, con dicho compuesto,
- b) determinar el nivel de progranulina en dicha muestra de dicho paciente y
- c) comparar el nivel determinado de dicha progranulina con uno o más valores de referencia.

[0181] Un "compuesto" es cualquier agente farmacéuticamente activo para el tratamiento de una inflamación sistémica, especialmente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o un choque séptico. Por ejemplo, el "compuesto" puede ser preferiblemente una o más sustancias químicas, un anticuerpo, proteína, péptido, ARNm antisentido, fármacos de peso molecular pequeño, o combinaciones de los mismos.

[0182] El nivel de progranulina en un material de muestra de dicho paciente puede determinarse mediante las técnicas de detección descritas anteriormente.

Literatura

[0183] Cuevas-Antonio R, Cancino C, Arechavaleta-Velasco F, et al. Expression of progranulin (Acrogranin/PCDGF/Granulin-Epithelin Precursor) in benign and malignant ovarian tumors and activation of MAPK signaling in ovarian cancer cell line. *Cancer Invest.* Jun 2010;28(5): 452-458.

[0184] Donald CD, Laddu A, Chandham P, et al. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. *Anticancer Res.* Nov-Dic 2001; 21(6A): 3739-3742.

[0185] Ong CH, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histol Histopathol.* Oct 2003; 18(4): 1275-1288.

[0186] Liau LM, Lallone RL, Seitz RS, et al. Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. *Cancer Res.* Mar 1 2000; 60(5): 1353-1360.

[0187] Matsumura N, Mandai M, Miyanishi M, et al. Oncogenic property of acrogranin in human uterine leiomyosarcoma: direct evidence of genetic contribution in in vivo tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* Mar 1 2006; 12(5): 1402-1419.

[0188] Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem.* Jul 2000;48(7): 999-1009.

[0189] Matsuwaki T, Asakura R, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Age-dependent changes in progranulin expression in the mouse brain. *J Reprod Dev.* Feb 2011;57(1): 113-119.

[0190] Cruts M, Van Broeckhoven C. Loss of progranulin function in frontotemporal lobar degeneration. *Trends Genet.* Abr 2008; 24(4): 186-194.

[0191] Youn BS, Bang SI, Kloting N, et al. Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes.* Mar 2009; 58(3): 627-636.

[0192] Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J. Clin. Invest.* Jul 2008; 118(7): 2438-2447.

[0193] Zhu J, Nathan C, Jin W, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell.* 13 Dic 2002; 111 (6): 867-878.

[0194] Kojima Y, Ono K, Inoue K, et al. Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis.* Sep 2009; 206(1): 102-108.

[0195] Riedel S., Carroll KC. Laboratory detection of sepsis: biomarkers and molecular approaches. Clin Lab Med. Sep 2013; 33(3): 413-37.

5 [0196] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med. Jun 1992; 20(6): 864-874.

10 [0197] Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. Crit Care Med. Jun 1992; 20(6): 724-726

Secuencias

15 [0198] La SEQ ID No. 1 corresponde a la progranulina de longitud completa de las especies indicadas, incluyendo un péptido señal.

[0199] La SEQ ID No. 2 corresponde a la progranulina madura de las especies indicadas sin un péptido señal.

[0200] SEQ ID No. 3 corresponde a ARNc que codifica la progranulina de las especies indicadas.

20 [0201] Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos solamente. La invención no debe interpretarse que se limita a los siguientes ejemplos:

Figuras:

25 [0202]

La figura 1 representa los niveles de progranulina en suero en todos los individuos incluidos diagnosticados con una sepsis (n = 10), los individuos diagnosticados con una sepsis grave (n = 10) y los individuos diagnosticados con un choque séptico (n = 20) y en individuos de control, con el error promedio y estándar de la media indicados.

30 La figura 2 muestra una curva característica operativa del receptor (ROC) obtenida representando gráficamente la sensibilidad frente a 1 – la especificidad usando un nivel de corte progranulina en suero de 170% del nivel en plasma de progranulina de individuos sanos de control para clasificar individuos enfermos de una inflamación sistémica frente a individuos de control.

35 La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de progranulina humana depositada como secuencia de referencia NCBI: NP_002078.1. La secuencia de aminoácidos de progranulina consiste en 593 aminoácidos, incluyendo un péptido señal N-terminal que se indica mediante subrayado.

La figura 4 muestra la secuencia de ARNm que codifica la progranulina humana depositada como secuencia de referencia NCBI: NM_002087.2.

Ejemplo 1:

40 [0203] A menos que se indique de otro modo, el ejemplo se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante de los sistemas analíticos.

45 [0204] Se determinaron los niveles de progranulina respectivos en el plasma humano usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas disponible comercialmente para la determinación cuantitativa de progranulina humana, progranulina humana ELISA 103, obtenido de Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH (Reutlingen, Alemania), .

50 [0205] Las respectivas muestras de plasma humano se obtuvieron de individuos de control sanos (n = 10), pacientes diagnosticados con una sepsis (n = 10), pacientes diagnosticados con una sepsis grave (n = 10) y pacientes diagnosticados con un choque séptico (n = 20).

55 [0206] Los respectivos pacientes fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios definidos por las definiciones de conferencia de consenso ACCP/SCCM para la sepsis o fallo orgánico (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Crit Care Med. 1992, páginas 864-874; Bone RC et al.: Crit Care Med 1992, páginas 724-726).

[0207] Las muestras se analizaron por triplicado.

60 [0208] La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm (filtro de referencia fijado a 590 nm) con un lector de ELISA disponible comercialmente (Mulfiskan® FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.).

5 [0209] Los niveles en plasma de progranulina determinados se representan en la figura 1. Los respectivos niveles plasmáticos de progranulina se representan como el porcentaje de aumento en comparación con el nivel en plasma de progranulina de individuos sanos, que se fija a 100% y que corresponde a un nivel en plasma de progranulina de 200 ng por ml.

[0210] Se utilizó un análisis de varianza de una cola de Kruskal-Wallis por rangos para comparar los respectivos subgrupos de pacientes.

10 [0211] La figura 2 muestra una curva característica operativa del receptor (ROC) obtenida mediante la representación de la fracción de verdaderos positivos de los positivos reales totales frente a la fracción del falso positivo de los negativos reales totales. Un nivel de corte de progranilina en suero del 170% del nivel en plasma de progranulina de individuos sanos de control se utiliza para clasificar los individuos enfermos de una inflamación sistémica frente a individuos de control.

15 [0212] Se calculó la estadística del área bajo la curva (AUC):

LISTADO DE SECUENCIAS

20 [0213]
 <110> Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH
 <120> Procedimiento para detectar una inflamación sistémica y sistema de análisis
 <130> 52236
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 25
 <210> 1
 <211> 593
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1).. (17)
 <223> Péptido señal
 35
 <400> 1

40

45

50

55

60

5 Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10

10 Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
20 25 30

15 Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
35 40 45

20 Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
50 55 60

25 Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65 70 75 80

30 Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
85 90 95

35 His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
100 105 110

40 Phe Gln Arg Ser Gly Asn Asn Ser Val Gly Ala Ile Gln Cys Pro Asp
115 120 125

45 Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
130 135 140

50 Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp

50

55

60

ES 2 661 894 T3

	145					150					155				160	
5	Arg	Val	His	Cys	Cys	Pro	His	Gly	Ala	Phe	Cys	Asp	Leu	Val	His	Thr
					165					170					175	
10	Arg	Cys	Ile	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro
				180					185					190		
15	Ala	Gln	Arg	Thr	Asn	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Met	Cys
			195					200					205			
20	Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Cys	Cys	Glu	Leu
		210					215					220				
25	Pro	Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Asn	Ala	Thr	Cys	Cys
	225					230					235					240
30	Ser	Asp	His	Leu	His	Cys	Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Leu	Ile
					245					250					255	
35	Gln	Ser	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Thr
				260					265					270		
40	Lys	Leu	Pro	Ala	His	Thr	Val	Gly	Asp	Val	Lys	Cys	Asp	Met	Glu	Val
			275					280					285			
45	Ser	Cys	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Cys	Cys	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Trp
		290					295					300				
50	Gly	Cys	Cys	Pro	Phe	Thr	Gln	Ala	Val	Cys	Cys	Glu	Asp	His	Ile	His
	305					310					315					320
55	Cys	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Thr	Cys	Asp	Thr	Gln	Lys	Gly	Thr	Cys	Glu
					325					330					335	
60	Gln	Gly	Pro	His	Gln	Val	Pro	Trp	Met	Glu	Lys	Ala	Pro	Ala	His	Leu
				340					345					350		
65	Ser	Leu	Pro	Asp	Pro	Gln	Ala	Leu	Lys	Arg	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Asn
			355					360					365			
70	Val	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Ser	Asp	Thr	Cys	Cys	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly
		370					375					380				
75	Glu	Trp	Gly	Cys	Cys	Pro	Ile	Pro	Glu	Ala	Val	Cys	Cys	Ser	Asp	His
	385					390					395					400

Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
 405 410 415
 5 Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
 420 425 430
 10 Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
 435 440 445
 15 Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
 450 455 460
 20 Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
 465 470 475 480
 25 Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
 485 490 495
 30 Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
 500 505 510
 35 His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
 515 520 525
 40 Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
 530 535 540
 45 Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
 545 550 555 560
 50 Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
 565 570 575
 55 Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
 580 585 590
 60 Leu
 <210> 2
 <211> 576
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 661 894 T3

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

	Cys	Pro	Asp 275	Gly	Tyr	Thr	Cys	Cys 280	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly 285	Ala	Trp	Gly
5	Cys	Cys 290	Pro	Phe	Thr	Gln	Ala 295	Val	Cys	Cys	Glu	Asp 300	His	Ile	His	Cys
10	Cys 305	Pro	Ala	Gly	Phe	Thr 310	Cys	Asp	Thr	Gln	Lys 315	Gly	Thr	Cys	Glu	Gln 320
15	Gly	Pro	His	Gln	Val 325	Pro	Trp	Met	Glu	Lys 330	Ala	Pro	Ala	His	Leu 335	Ser
20	Leu	Pro	Asp	Pro 340	Gln	Ala	Leu	Lys	Arg 345	Asp	Val	Pro	Cys	Asp 350	Asn	Val
25	Ser	Ser	Cys 355	Pro	Ser	Ser	Asp	Thr 360	Cys	Cys	Gln	Leu	Thr 365	Ser	Gly	Glu
30	Trp	Gly 370	Cys	Cys	Pro	Ile	Pro 375	Glu	Ala	Val	Cys	Cys	Ser	Asp	His	Gln
35	His 385	Cys	Cys	Pro	Gln	Gly 390	Tyr	Thr	Cys	Val	Ala 395	Glu	Gly	Gln	Cys	Gln 400
40	Arg	Gly	Ser	Glu	Ile 405	Val	Ala	Gly	Leu	Glu 410	Lys	Met	Pro	Ala	Arg 415	Arg
45	Ala	Ser	Leu	Ser 420	His	Pro	Arg	Asp	Ile 425	Gly	Cys	Asp	Gln	His 430	Thr	Ser
50	Cys	Pro	Val 435	Gly	Gln	Thr	Cys	Cys 440	Pro	Ser	Leu	Gly	Gly 445	Ser	Trp	Ala
55	Cys	Cys 450	Gln	Leu	Pro	His	Ala 455	Val	Cys	Cys	Glu	Asp 460	Arg	Gln	His	Cys
60	Cys 465	Pro	Ala	Gly	Tyr	Thr 470	Cys	Asn	Val	Lys	Ala 475	Arg	Ser	Cys	Glu	Lys 480
65	Glu	Val	Val	Ser	Ala 485	Gln	Pro	Ala	Thr	Phe 490	Leu	Ala	Arg	Ser	Pro 495	His
70	Val	Gly	Val	Lys 500	Asp	Val	Glu	Cys	Gly 505	Glu	Gly	His	Phe	Cys 510	His	Asp
75	Asn	Gln	Thr 515	Cys	Cys	Arg	Asp	Asn 520	Arg	Gln	Gly	Trp	Ala 525	Cys	Cys	Pro

ES 2 661 894 T3

Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro Ala
530 535 540

5

Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu Ala
545 550 555 560

10

Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
565 570 575

15

<210> 3
<211> 2323
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 3

25

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 661 894 T3

ggcgagagga agcagggagg agagtgattt gagtagaaaa gaaacacagc attccaggct 60
 ggccccacct ctatattgat aagtagccaa tgggagcggg tagccctgat ccctggccaa 120
 5 tggaaactga ggtagggcgg tcatcgcgct ggggtctgta gtctgagcgc taccgggtg 180
 ctgctgcca aggaccgcg agtcggacgc aggcagacca tgtggaccct ggtgagctgg 240
 10 gtggccttaa cagcagggct ggtggctgga acgcggtgcc cagatggtea gttctgcct 300
 gtggcctgct gcctggacc cggaggagcc agctacagct gctgccgtcc ccttctggac 360
 15 aatggcca caaactgag caggcatctg ggtggcccct gccaggttga tgcccactgc 420
 tctgccggcc actcctgcat cttaccgctc tcagggactt ccagttgctg ccccttcca 480
 gaggcctgg catgcgggga tggccatcac tgctgccac ggggcttcca ctgcagtga 540
 20 gacggcgat cctgcttcca aagatcaggt aacaactccg tgggtgccat ccagtgcct 600
 gatagtcagt tcgaatgcc ggacttctcc acgtgctgtg ttatggtea tggctcctgg 660
 25 ggggtgctgcc ccatgcccc ggcttctgc tgtgaagaca gggtgactg ctgtccgcac 720
 ggtgccttct gcgacctggt tcacaccgc tgcatcacac ccacgggcac ccacccctg 780
 30 gcaaagaagc tccctgcca gaggactaac agggcagtgg ccttgtccag ctcggtcatg 840
 tgtccggacg cacggtccc gtgccctgat ggttctacct gctgtgagct gccagtggt 900
 aagtatggt gctgccaat gcccaacgcc acctgctgct ccgatcacct gcaactgctgc 960
 35 cccaagaca ctgtgtgtga cctgatccag agtaagtgcc tctccaagga gaacgctacc 1020
 acggacctcc tactaagct gcctgcgcac acagtgggg atgtgaaatg tgacatggag 1080
 40 gtgagctgcc cagatggcta tacctgctgc cgtctacagt cgggggcctg gggctgctgc 1140
 ccttttacc aggctgtgtg ctgtgaggac cacatacact gctgtcccgc ggggtttacg 1200
 45 tgtgacacgc agaagggtac ctgtgaacag gggccccacc aggtgccctg gatggagaag 1260
 gccccagctc acctcagcct gccagacca caagccttga agagagatgt ccctgtgat 1320

50

55

60

ES 2 661 894 T3

	aatgtcagca gctgtccctc ctccgatacc tgctgccaac tcacgtctgg ggagtggggc	1380
	tgctgtccaa tcccagaggc tgtctgctgc tcggaccacc agcactgctg cccccagggc	1440
5	tacacgtgtg tagctgaggg gcagtgtcag cgaggaagcg agatcgtggc tggactggag	1500
	aagatgcctg cccgccgggc ttccttatcc cccccagag acatcggctg tgaccagcac	1560
10	accagctgcc cgggtggggca gacctgctgc ccgagcctgg gtgggagctg ggcctgctgc	1620
	cagttgcccc atgctgtgtg ctgcgaggat cgccagcact gctgcccggc tggctacacc	1680
15	tgcaacgtga aggctcgatc ctgcgagaag gaagtggctc ctgccagcc tgccaccttc	1740
	ctggcccgtg gccctcacgt ggggtgtgaag gacgtggagt gtggggaagg acacttctgc	1800
20	catgataacc agacctgctg ccgagacaac cgacagggct gggcctgctg tccctaccgc	1860
	cagggcgtct gttgtgctga tcggcgccac tgctgtcctg ctggcttccg ctgocgagcc	1920
	aggggtacca agtgtttgcg cagggaggcc ccgcgctggg acgcccttt gagggacca	1980
25	gccttgagac agctgctgtg agggacagta ctgaagactc tgcagccctc gggacccac	2040
	tcggaggggtg ccctctgctc aggcctccct agcacctccc cctaaccaa ttctccctgg	2100
30	acccattct gagctcccca tcaccatggg aggtggggcc tcaatctaag gccttccctg	2160
	tcagaagggg gttgtggcaa aagccacatt acaagctgcc atcccctccc cgtttcagtg	2220
35	gacctgtgg ccaggtgctt ttccctatcc acaggggtgt ttgtgtgtgt gcgcgtgtgc	2280
	gtttcaataa agtttgtaca ctttcaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa	2323

40

45

50

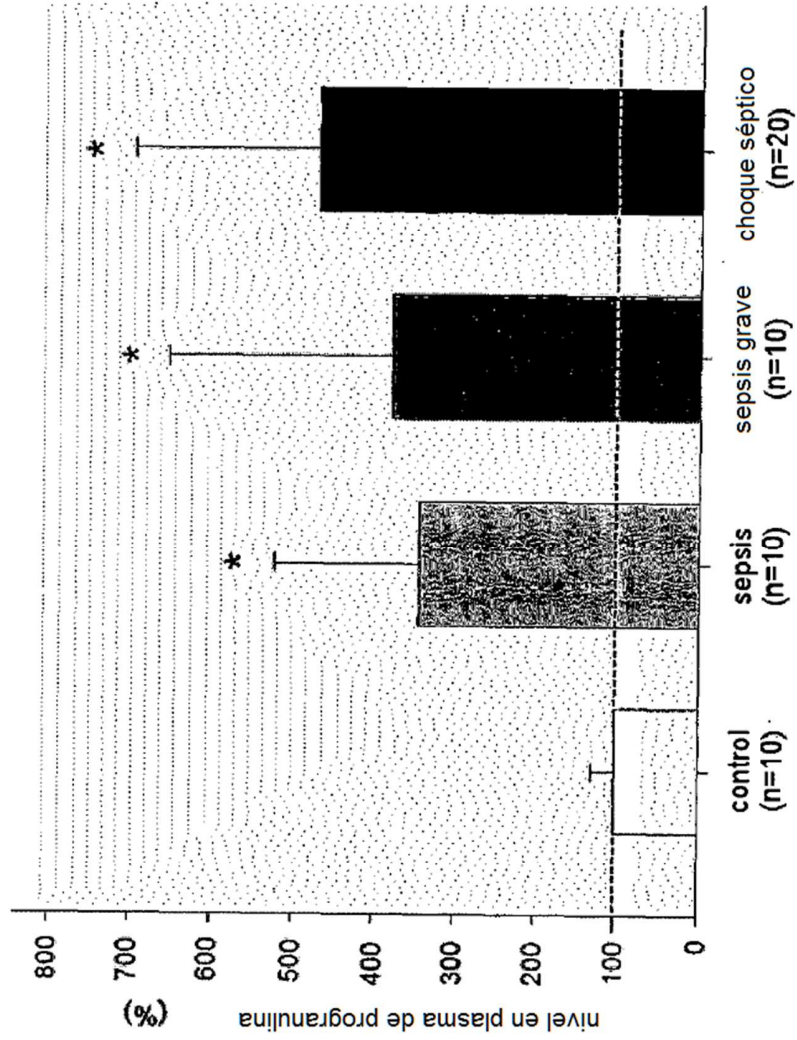
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar una inflamación sistémica que comprende:
 5 a) proporcionar una muestra aislada que se ha tomado de un individuo,
 b) determinar un nivel patológico de progranulina en dicha muestra aislada.
2. Procedimiento de seguimiento del desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de una inflamación sistémica que comprende:
 10 a) proporcionar una primera muestra aislada de un individuo en un primer punto de tiempo,
 b) determinar un nivel de progranulina en dicha primera muestra,
 c) proporcionar al menos una segunda muestra aislada de dicho individuo en un segundo punto de tiempo, en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a dicho primer punto de tiempo,
 15 d) determinar el nivel de progranulina en dicha muestra aislada,
 e) comparar el nivel determinado de progranulina en dicha segunda muestra con el nivel de progranulina en dicha primera muestra,
 en el que un aumento del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de la progresión de una inflamación sistémica, y/o el empeoramiento de la evolución y/o que el tratamiento es ineficaz, y
 20 en el que una disminución del nivel de progranulina en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de progranulina en dicha primera muestra es indicativo de la ralentización de la progresión de una inflamación sistémica, y/o la mejora de la evolución y/o que el tratamiento es eficaz.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho nivel de progranulina en dicha muestra se determina mediante procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, análisis de expresión génica y/o espectroscopía de masas.
 25
4. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que dicho nivel de progranulina en dicha primera muestra y/o dicha segunda muestra se determina mediante procedimientos inmunológicos, técnicas de proteómica, análisis de expresión génica y/o espectroscopía de masas.
- 30 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico.
6. Procedimiento, según de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma sanguíneo, suero, líquido linfático, líquido cerebroespinal (CSF), líquido amniótico, saliva, orina, leche materna y mezclas de los mismos.
 35
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de progranulina en dicha muestra, preferiblemente plasma sanguíneo, es 120% de un nivel no patológico calculado como el nivel promedio de progranulina determinado en muestras aisladas de una pluralidad de individuos sin enfermedad de inflamación sistémica.
 40
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha progranulina comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 1 y 2.
- 45 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicha progranulina es un homólogo de la SEQ ID No. 1 o 2 que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de SEQ ID No. 1 o 2, respectivamente.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que, adicionalmente, se determina un nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en procalcitonina (PCT), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa, proteína C reactiva (CRP), componente P amiloide del suero, amiloide A del suero, factor del complemento, lectina de unión a manano, fibrinógeno, protrombina, factor VIII, factor de con Willebrand, plasminógeno, alfa 2-macroglobulina, ferritina, hepcidina, ceruloplasmina, haptoglobina, alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), alfa 1-antitripsina, alfa 1-antiquimotripsina, albúmina, proteína de unión a retinol, antitrombina, transcortina, y mezclas de las mismas.
 50
- 55 11. Uso de un sistema de análisis para la detección de una inflamación sistémica en una muestra aislada de un individuo que comprende:
 a) al menos una molécula de detección que reconoce específicamente la progranulina,
 b) un reactivo para detectar la unión de progranulina a dicha al menos una molécula de detección, y
 60 c) opcionalmente, un soporte sólido que soporta dicha al menos una molécula de detección.
12. Uso de un sistema de análisis, según la reivindicación 11, en el que dicho sistema de análisis es un ensayo de análisis

de expresión génica o un inmunoensayo, preferiblemente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo de luminiscencia (LIA), una transferencia Western, una inmunoprecipitación, una citometría de flujo o un biochip.

- 5 13. Procedimiento para determinar si un compuesto es eficaz en el tratamiento de una inflamación sistémica que comprende:
- a) proporcionar una muestra aislada de un individuo enfermo de inflamación sistémica y tratado con un compuesto,
 - b) determinar el nivel de progranulina en dicha muestra aislada de dicho individuo, y
 - c) comparar el nivel determinado de progranulina con uno o más valores de referencia.
- 10 14. Progranulina para usar como biomarcador para una inflamación sistémica.
- 15 15. Progranulina, según la reivindicación 14, en la que dicha inflamación sistémica es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico.

Figura 1:



* p<0,01 Análisis de varianza de una cola por rangos de Kruskal-Wallis
Todos los procedimientos de comparación múltiple por parejas (método de Dunn)

Figura 2:

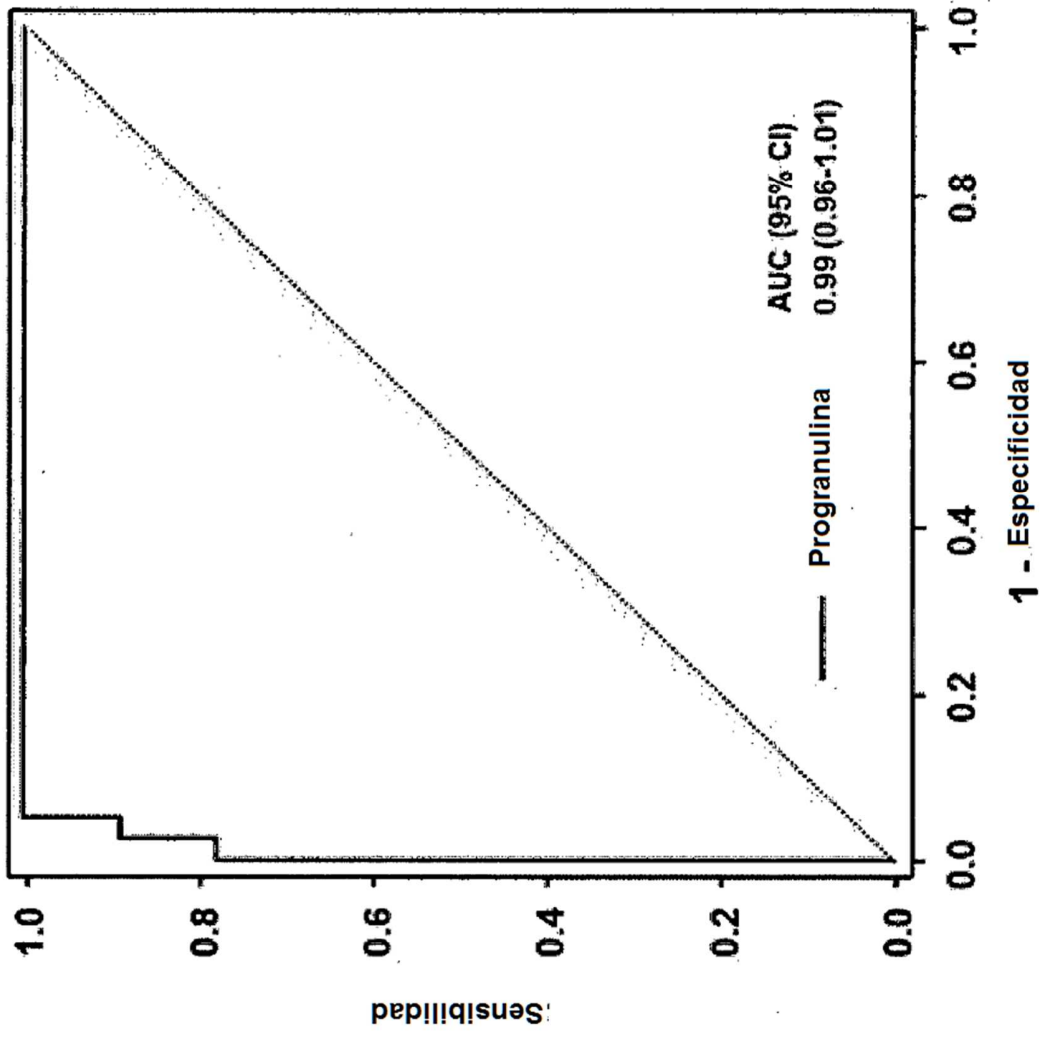


Figura 3:

Secuencia de referencia NCBI: : NP_002078.1

Progranulina (precursor de granulinas)

Organismo: Homo Sapiens

```

1  MWTLVSWVAL TAGLVAGTRC PDGQFCPVAC CLDPGGASYS CCRPLLDKWP TTLSRHLGGP
61  CQVDAHCSAG HSCIFTVSGT SSCCPFPEAV ACGDGHHCPC RGFHCSADGR SCFQRSGNNS
121 VGAIQCPDSQ FECPDFSTCC VMVDGSWGCC PMPQASCCED RVHCCPHGAF CDLVHTRCIT
181 PTGTHPLAKK LPAQRTNRAV ALSSVVMCPD ARSRCPDGST CCELP SGKYG CCPMPNATCC
241 SDHLHCCPQD TVCDLIQSKC LSKENATDLD LTKLPAHTVG DVKCDMEVSC PDGYTCCRLO
301 SGAWGCCPFT QAVCCEDHIH CCPAGFTCDT QKGTCEQGP QVPWMEKAPA HLSLPDPQAL
361 KRDVPCDNVS SCPSSDTCCQ LTSGEWGCCP IPEAVCCSDH QHCCPQGYTC VAEGQCQRGS
421 EIVAGLEKMP ARRASLSHPR DIGCDQHTSC PVGQTCCPSL GGSWACCQLP HAVCCEDRQH
481 CCPAGYTCNV KARSCEKEVV SAQPATFLAR SPHVGVKDVE CGEGHFCHDN QTCCRDNRQG
541 WACCPYRQGV CCADRRRHCCP AGFRCAARGT KCLRREAPRW DAPLRDPALR QLL

```

Figura 4:

Secuencia de Referencia NCBI: : NM_002087.2

ARNm de programulina (precursor de granulinas)

Organismo : Homo sapiens

```

1  ggcgagagga agcaggagg agagtgatt gtagaanaa gaaacacagc attccaggct
61  ggcccacct ctatatgat aagtagccaa tgggagcggg tagccctgat cccctggccaa
121  tggaaactga ggtaggcggg tcaatcgcgt ggggtctgta gctgagcgc tacccggtt
181  ctgctgccc agaacgcgg agtcggacgc aggeagacca tgtgacctt ggtgagctgg
241  gtggccttaa cagcaggct ggtggctgga acgcggtgcc cagatggtca gttctgccc
301  gtgacctgct gcctggacc cggaggagcc ggtgacctt gccaggttga tggccactgc
361  aaatggccc caaactgag caggcatctg ggtggcccc ccaagttgtg ccccttcca
421  tctgcccgc actcctgat cttaccgtc tcaaggactt ccaagttgtg ccccttcca
481  gaggcctgg catggggga tggccatcac tgcctgccac ggggcttcca ctgcaagtga
541  gacggcgtat cctgctcca aagatcaggt acaactccg tgggtgccat ccaagtccct
601  gatagtcagt tgaatgcc ggaacttccc acgtgctgtg ttatgctga tggctcctgg
661  gggctgctgc ccatgccca ggttccctgc tgtgaagaca ggtgactgc ctgtccgca
721  ggtgcttct. ggcactggt tcaaccccgc tgcatacac ccacgggca ccaacccctg
781  gcaaaagaag tccctgcca gaggactaac agggcagttg cctgtccag ctcggtcatg
841  tgtccggagc cacggtccc gtcacctgat ggtttacct cctgtccag gccagttggg
901  aagtatggct gctgccaat gcccaagcc agttctgct cgcatacct ccaagctctg
961  ccccaagaca ctgtgtgta cctgatccag agtaagtgcc tctccaagga gaacgtacc
1021  acggacctcc tcaactaagt gcctgcgcac acagtggggg atgtgaaatg tgacatggag
1081  gtgagctgcc cagatggcta taccctgctc cgtctacagt cggggcctg gggctgctgc
1141  cttttacc agctgtgtg ctgtgaggac cacatacact gctgtcccg ggggtttacc
1201  tgtgacacgc aaaaaggtac ctgtgaacag gggcccacc agtgccctg gatggagaag
1261  gcccagctc acctcagct gccagacca caagcttga agagatgt cccctgtgat
1321  aatgtcagca gctgcccct ctcgatacc tgcctccaac tcacgtctgg gtagtggggc
1381  tctgtccaa tcccagaggc tctctgctgc tggaccacc agcactgctg ccccagggc
1441  tacactgtg tagctgagg gcaagtgtcag cgaagaagcg agatcgtggc tggactggag
1501  aagatgctg cccgcgggc ttccttacc ccccacag acatcgtctg tgaccagcac
1561  accagctgc cgggtgggca gacctgctc ccgagcctgg gtgggagctg ggctgctgc
1621  cagttgccc atgtgtgtg ctgagaggat cgcacagcact gctgcccgc tggctacacc
1681  tgcaactga agctcgatc ctgagagaag gaagtgtct ctgcccagcc tgcaccctc
1741  ctggccccta cccctcact ggggtgtaag gactggagt gtgggaaag acactctgc
1801  catgataacc agacctgct cagagacaa cgaacggctt gggcctgtg tccctaccg
1861  caggcgtct gttgtctga tgggcgccc tgcctcctg ctggcttccg ctgcccagcc
1921  aggggtacca agtgttgcg cgggagggc ccgagctggg acgcccctt gagggaccca
1981  gccttgagac agctgctgt agggacagta ctgaagactc tgcagccctt ggaacccca
2041  tggaggggtg cccctgctc agcctcctt agcactccc cctaacaaa tctccttg
2101  acccattct gagtcccca tcaacatgg aggtggggcc tcaatctaa gecttccctg
2161  tcagaagggg gttgtggcaa aagccacat acagctgcc atccctccc cgtttcagtg
2221  gccctgtgg ccaggtgctt ttcccctacc acaggggtgt ttgtgtgtg gggcgtgtgc
2281  gtttcaataa agttgtaca cttcaaaaa aaaaaaaaa aaa
    
```