(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 271 580**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **03725036 .2**
(86) Fecha de presentación : **15.04.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1497662**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

(54) Título: **Utilización de carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS 1) y sus fragmentos para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias y septicemia.**

(30) Prioridad: **19.04.2002 EP 02008841**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

(73) Titular/es: **B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft**
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

(72) Inventor/es: **Bergmann, Andreas;**
Struck, Joachim y
Ühlein, Monika

(74) Agente: **Gallego Jiménez, José Fernando**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Utilización de carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS 1) y sus fragmentos para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias y septicemia.

La presente invención se refiere a aplicaciones del enzima carbamoilfosfato sintetasa 1 (E.C. 6.3.4.16, de ahora en adelante siempre abreviado como CPS 1) y nuevos fragmentos del mismo para el diagnóstico médico de la septicemia. Se basa en la detección por primera vez de la aparición de fragmentos del CPS 1 en el tejido hepático de primates, en los que se generó experimentalmente septicemia o inflamación sistémica mediante la administración de toxinas, así como la detección final de concentraciones de CPS 1 muy elevadas en la circulación de los pacientes septicémicos.

La presente invención tiene su origen en intensos trabajos de investigación del solicitante junto con otros perfeccionamientos del diagnóstico y el tratamiento de inflamaciones e infecciones, en especial inflamaciones de etiología infecciosa y septicemia.

Se designan como inflamaciones de forma general determinadas reacciones fisiológicas de un organismo ante diversos efectos exteriores como por ejemplo heridas, quemaduras, alergenos, infecciones por microorganismos tales como bacterias y hongos y virus, ante tejidos alógenos que desencadenan reacciones de rechazo, o ante determinados estados endógenos desencadenantes de inflamación del cuerpo, como por ejemplo en enfermedades autoinmunes y cáncer. Las inflamaciones pueden presentarse como reacciones del cuerpo inofensivas y localmente limitadas, pero también son características típicas de numerosas enfermedades crónicas y agudas graves de distintos tejidos, órganos y partes de órganos y tejidos.

Las inflamaciones locales son por lo general parte de la reacción inmunológica sana del cuerpo frente a efectos perjudiciales, y con ello parte del mecanismo de defensa del organismo que ayuda al mantenimiento de la vida. Sin embargo, cuando las inflamaciones forman parte de una reacción errónea del cuerpo ante determinados procesos endógenos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, y/o de naturaleza crónica, o si alcanzan una determinada magnitud sistémica, como en el caso del síndrome de inflamación sistémica (Systemic Inflammatory Response Síndrome, SIRS), o en el caso de una septicemia grave atribuible a causas infecciosas, se descontrolan los procesos fisiológicos típicos de las reacciones inflamatorias y se convierten en un suceso patológico propio, a menudo muy peligroso.

Se sabe hoy que la aparición y el curso de los procesos inflamatorios son controlados por un número considerable de sustancias, en su mayoría de naturaleza proteínica o peptídica, o que vienen acompañados por la aparición, más o menos limitada en el tiempo, de determinadas biomoléculas. Entre las sustancias endógenas que acompañan a las reacciones inflamatorias se cuentan en especial aquellas que pueden contarse entre las citoquinas, los mediadores, las sustancias vasoactivas, las proteínas de fase aguda y/o los reguladores hormonales. La reacción inflamatoria constituye una reacción fisiológica compleja en la que participan tanto las sustancias endógenas activadoras del proceso inflamatorio (por ejemplo TNF-α) como también sustancias desactivadoras (por ejemplo interleucina-10).

En las inflamaciones sistémicas como en el caso de una septicemia o de un shock séptico, las reacciones en cascada específicas de la inflamación se extienden de manera descontrolada a todo el cuerpo y se vuelven, en el sentido de una respuesta inmune excesiva, amenazantes para la vida. Para los conocimientos actuales sobre la aparición y el posible papel de cada uno de los grupos de sustancias endógenas específicas de la inflamación se remite, por ejemplo, a A. Beishuizen, *et al*., "Endogenous Mediators in Sepsis and Septic SOC", Advances in Clinical Chemistry, Vol. 33, 1999, 55-131; y Gabay, *et al*., "Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation", The New England Journal of Medicine, Vol. 340, No. 6, 1999, 448-454. Puesto que en los últimos años ha cambiado la comprensión de la septicemia y de las enfermedades inflamatorias sistémicas emparentadas, y con ello también las definiciones admitidas, se remite también a K. Reinhart, *et al*., "Sepsis und septischer Schock", en Intensivmedizin, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New Cork, 2001, 756-760; donde se da una definición moderna del concepto de septicemia. Dentro del marco de la presente solicitud, los conceptos de septicemia o de enfermedades inflamatorias se utilizan basándose en las definiciones que han podido obtenerse de las tres citas bibliográficas anteriores.

Mientras que, al menos en el ámbito europeo, la infección bacteriana sistémica detectable mediante un cultivo positivo en sangre caracterizó durante mucho tiempo el concepto de septicemia, la septicemia se entiende hoy sobre todo como una inflamación sistémica que tiene causas infecciosas, pero que como suceso patológico presenta grandes similitudes con las inflamaciones sistémicas desencadenadas por otras causas. El citado cambio en la comprensión de la septicemia se corresponde con las modificaciones en los planteamientos diagnósticos. Así, la detección directa de agentes patógenos bacterianos se sustituyó o completó mediante controles complejos de parámetros fisiológicos y en tiempo más reciente, en especial, también por la detección de determinadas sustancias endógenas participantes en el suceso septicémico o inflamatorio, es decir, "biomarcadores" específicos.

Del gran número de mediadores y proteínas de fase aguda de las que se sabe que participan en el suceso inflamatorio, para fines de diagnóstico son apropiados en especial aquellos cuya aparición es muy específica de las enfermedades inflamatorias o de determinadas fases de enfermedades inflamatorias, cuyas concentraciones varían de manera drástica y diagnósticamente significativa y que, además, presentan las estabilidades necesarias para las determinaciones rutinarias y que alcanzan valores de concentración elevados. Para fines diagnósticos aparece en un primer plano

la correlación probada entre suceso patológico (inflamación, septicemia) y el correspondiente biomarcador, sin que tenga que conocerse su papel en la compleja cascada de sustancias endógenas participantes en el suceso inflamatorio.

Una sustancia endógena de este tipo especialmente adecuada como biomarcador de septicemia es procalcitonina. La procalcitonina es una prohormona cuyas concentraciones en suero alcanzan valores muy elevados bajo las condiciones de una inflamación sistémica de etiología infecciosa (septicemia), mientras que en las personas sanas prácticamente es indetectable. Además, valores elevados de procalcitonina se alcanzan en un estadio relativamente temprano de una septicemia, de tal manera que la determinación de procalcitonina es adecuada también para la detección precoz de una septicemia y para diferenciar tempranamente una septicemia de origen infeccioso de una inflamación grave debida a otras causas. La determinación de procalcitonina como marcador de la septicemia es objeto de la publicación M. Assicot, *et al*., "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection", The Lancet, vol. 341, No. 8844, 1993, 515-518; y las patentes DE 42 27 454 C2 ó EP 0 656 121 B1 ó US 5,639,617. Para completar la presente descripción se remite de manera expresa a las citadas patentes y a la bibliografía indicada en las citadas publicaciones.

La disponibilidad del marcador de septicemia procalcitonina ha dado grandes impulsos a la investigación de la septicemia y actualmente se están realizando grandes esfuerzos para encontrar otros biomarcadores que puedan completar la determinación de procalcitonina y/o que para fines de un diagnóstico precoz o un diagnóstico diferencial puedan proporcionar información adicional. Sin embargo, la búsqueda de potenciales nuevos biomarcadores de septicemia se ve dificultada por el hecho de que a menudo se sabe muy poco, o nada, sobre el funcionamiento exacto o los motivos precisos de la aparición de determinadas sustancias endógenas que participan en el suceso inflamatorio o septicémico.

Los resultados de la comprobación experimental de un fecundo planteamiento puramente hipotético para determinar otros potenciales marcadores de la septicemia se encuentran en DE 198 47 690 A1 ó WO 00/22439. Allí se indica que en la septicemia no sólo aumenta la concentración de la prohormona procalcitonina, sino que también pueden observarse concentraciones significativamente elevadas para otras sustancias que muestran la inmunorreactividad de la prohormona. Mientras que el fenómeno descrito está bien documentado, se desconocen en gran medida las causas del aumento de las concentraciones de las distintas sustancias correspondientes en la septicemia.

En la presente solicitud se informa sobre un resultado de otro fecundo planteamiento puramente hipotético para la búsqueda de otras biomoléculas específicas de la inflamación o de la septicemia. También estos estudios experimentales parten de la determinación de procalcitina en relación con reacciones inflamatorias sistémicas de etiología infecciosa. Así, pronto se observó que en la septicemia la procalcitonina evidentemente no se forma de la misma manera que cuando es precursor de la hormona calcitonina. Se observaron así niveles altos de procalcitonina incluso en pacientes a los que se les había extirpado el tiroides. Por ese motivo, el tiroides no puede ser el órgano en el que se forma o se vierte la procalcitonia en la septicemia. En las publicaciones H. Redl, *et al*., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol. 28. No. 11, 3659-3663; y H. Redl, *et al*., "Non-Human Primate Models of Sepsis", Sepsis 1998; 2:243-253; se informa sobre los resultados de estudios experimentales que deberían servir para aclarar la formación de procalcitonina en la septicemia. En los citados trabajos se genera mediante la administración de endotoxinas una septicemia artificial en primates (papiones) y se determina en qué estados generados experimentalmente se alcanzan las mayores concentraciones de procalcitonina en sangre. Un perfeccionamiento del modelo de experimento animal descrito en los mencionados trabajos sirve, dentro del marco de la presente solicitud, para determinar biomarcadores endógenos específicos de la septicemia de naturaleza péptica o proteínica cuya aparición es característica de la septicemia o de determinadas formas de la septicemia y que, por consiguiente, hacen posible un diagnóstico específico de la septicemia. Por ese motivo, debido a la gran similitud de la fisiología de primates y seres humanos y a la elevada reactividad cruzada con muchos reactivos humanos terapéuticos y diagnósticos, se eligió el modelo de primates.

Ya que las sustancias formadas en las inflamaciones son parte de las complejas reacciones en cascada del cuerpo, las sustancias de este tipo no son sólo además de interés diagnóstico sino que en la actualidad se intenta, con grandes esfuerzos, intervenir terapéuticamente en el suceso inflamatorio influyendo sobre la formación y/o la concentración de sustancias individuales de este tipo para detener lo antes posible la extensión de la inflamación sistémica observada, por ejemplo, en la septicemia. En este sentido deben considerarse también como objetivos terapéuticos potenciales las sustancias endógenas que participan de manera demostrable en el suceso inflamatorio. A pesar de los resultados hasta la fecha bastante decepcionantes de los planteamientos terapéuticos de este tipo, sigue teniendo un gran interés identificar biomoléculas endógenas lo más específicas posible de la inflamación o la septicemia no descritas hasta la fecha en ese contexto, que también como objetivos terapéuticos abren nuevas perspectivas de éxito para el control terapéutico de la septicemia.

La presente invención se basa en que en primates y en seres humanos durante la septicemia pueden detectarse en la circulación concentraciones claramente elevadas del enzima carbamoilfosfato sintetasa (CPS 1), así como fragmentos del mismo, y en concreto a diferencia de individuos de control no tratados o personas sanas en los que no se encontraron, lo cual hace del CPS 1 que sea adecuado para el diagnóstico de la septicemia.

Los procedimientos diagnósticos *in vitro*, que son accesibles debido a la aparición constatada de CPS 1 y sus fragmentos en la simulación experimental de la septicemia, así como a la detección de concentraciones de CPS 1 - inmunorreactividad claramente elevadas en sueros de septicémicos, se reivindican en las reivindicaciones 1 a 10.

Tal como se explicará a continuación con más detalle en la parte experimental, el punto de partida de la invención fue la comprobación de que después de desencadenar experimentalmente una septicemia artificial en papiones mediante la administración de endotoxinas (LPS de *Salmonella Typhimurium*) y el tratamiento electroforético bidimensional en gel del tejido hepático de los animales tratados, pudo encontrarse un grupo de spots de proteína vecinos identificables sólo en los animales tratados. Los productos proteínicos correspondientes a los spots con masas molares (determinadas mediante electroforesis en gel) de aproximadamente 68 kDa, 69 kDa y 70 kDa ± 3 kDa se aislaron a partir del gel de electroforesis, se analizaron mediante espectrometría de masas y se identificaron como fragmentos solubles de CPS 1.

A continuación, utilizando un inmunoensayo que reconocía los citados fragmentos, se constató que en la circulación de los pacientes septicémicos se encontraron en concentraciones muy elevadas componentes con inmunorreactividad de estos fragmentos, resultando ser estos componentes en una identificación más precisa (entre otras cosas, separación y determinación del peso molecular), al menos en su mayoría, enzima CPS 1 completa o como mínimo casi completa.

En el análisis por espectrometría de masas de tres spots de proteína aislados del gel, que como tales presentaban una intensidad relativamente baja, mediante espectrometría de masas en tándem a partir de los tres spots de proteína se identificaron secuencias parciales de péptidos cortas y parcialmente idénticas ("tags") que en forma idéntica volvieron a encontrarse en la secuencia del CPS 1 humano (SEQ ID NO: 6), comprendiendo los péptidos identificados de manera concreta secuencias de aminoácidos de la zona N-terminal del aminoácido CPS 1 hasta la posición 624 del CPS 1 (SEQ ID NO: 6).

Debido a la identidad de los fragmentos identificados mediante espectrometría de masas con las secuencias parciales procedentes de la parte N-terminal del CPS 1, la identificación de los spots de proteína analizados como fragmentos de CPS 1 se considera unívoca según criterios reconocidos.

La identificación de las proteínas, encontradas en el tejido hepático de papiones sólo después de provocar septicemia o inflamación, como fragmentos de la parte N-terminal del CPS 1 tiene un gran interés científico, diagnóstico y terapéutico.

La posterior demostración de que en la circulación de los pacientes septicémicos humanos se observan concentraciones fuertemente elevadas de una o varias especies con la inmunorreactividad de los fragmentos de CPS 1 identificados, que no obstante resultaron ser la enzima CPS 1 completa o al menos esencialmente completa y que eventualmente puede haber también una forma solubilizada especial, incrementa el valor de los primeros hallazgos descritos.

Hasta la fecha, el CPS 1 o los fragmentos de CPS 1 no han desempeñado prácticamente ningún papel en el diagnóstico médico. No obstante, el enzima CPS 1 (E.C. 6.3.4.16) mismo es bien conocido desde hace tiempo. Cataliza la transformación de amoniaco, bicarbonato y 2 ATP formando carbamoilfosfato en la primera etapa del ciclo de la urea. Desempeña también un determinado papel en la biosíntesis de la arginina que, por su parte, es un sustrato para la biosíntesis de NO, por ejemplo en caso de un shock por endotoxinas (véase Shoko Tabuchi *et al*., Regulation of Genes for Inductible Nitric Oxide Synthase and Urea Cycle Enzymes in Rat Liver in Endotoxin SOC, Biochemical and Biophysical Research Communications 268, 221-224 (2000)). El CPS 1 debe diferenciarse del enzima citosólico CPS 2 (E.C. 6.3.5.5) que igualmente desempeña un papel en el ciclo de la urea, aunque trata el sustrato glutamina. Se sabe que CPS 1 está localizado en las mitocondrias y que en el tejido hepático está presente en esta forma en grandes cantidades (supone aproximadamente el 2-6% de la proteína total del hígado). Su secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) y su localización genética se conocen desde hace tiempo (véase Haraguchi Y. *et al*., Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular análisis of hyperammonemia, Gene 1991, Nov. 1; 107 (2):- 335-340). Acerca de su papel fisiológico puede remitirse a artículos de revisión tales como por ejemplo H.M. Holder *et al*., Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product, CMLS, Cell.Mol.Life Sci. 56 (1999) 507-522 y la bibliografía allí referenciada, así como a la introducción de la publicación de Mikiko Ozaki *et al*., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Carbamoylphosphate Synthetase I: Plasma Enzyme in Rat Experimental Hepatitis and Its Clearance, Enzyme Protein 1994, 95:48:213-221.

En un trabajo de Ardawi M S M en: Clinical Science (1992) 82, 709-716 se estudia el cambio de actividad de los enzimas hepáticos en ratas septicémicas. Allí se analizan por un lado los cambios en la concentración de metabolitos formados por los enzimas hepáticos en la sangre de ratas. Se analizó la actividad de los enzimas del ciclo de la urea tal como CPS 1 en el tejido hepático. No se describió la aparición de CPS 1 o una determinación de CPS 1 en la circulación.

Según Shojo Tabuchi *et al*., loc.cit., en los hígados de rata con shock de endotoxina (LPS) artificial no se observa ningún aumento del enzima (proteína). Según Li Yin *et al*., Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol, Journal of Hepatology 1999, 31: 497-507, en una lesión hepática provocada por alcohol alílico se observó en los análisis histológicos, al cabo de tres días, un aumento de la expresión de CPS 1 en todos los hepatocitos.

Se demostró además que en el modelo de ratas, en caso de una hepatitis aguda generada experimentalmente mediante la administración de galactosamina se encuentra en el plasma de las ratas una actividad inmunológica del CPS 1 fuertemente incrementada (verificado con un ELISA con IgG anti-CPS 1 de rata procedente de conejos) y en concreto

24-48 h después del tratamiento con la galactosamina desencadenante de la hepatitis. Durante la hepatitis aguda se reconoce en el plasma de rata también un aumento de los fragmentos de CPS 1 con masas molares de aproximadamente 140 y 125 kDa, sin ninguna otra caracterización más precisa (asignación de secuencias), mientras que en un análisis concomitante por inmuno-blotting en muestras humanas procedentes de autopsia no pudieron observarse fragmentos de CPS 1 con inmunorreactividad CPS 1 (Mikiko Ozaki *et al*., loc. cit.).

A partir de los hallazgos en la bibliografía no puede deducirse una idoneidad del CPS 1 esencialmente completo y de los fragmentos de CPS 1 solubles, en especial de los fragmentos con masas molares de 68-70 kDa ± 3 kDa procedentes de la parte N-terminal del CPS 1, como biomarcadores para el diagnóstico de inflamaciones y de la septicemia en seres humanos, que puedan determinarse en el suero o plasma humanos.

Debido al aumento demostrado en la formación del CPS 1 humano en la septicemia, y de fragmentos de CPS 1 en papiones con una septicemia generada experimentalmente, y concretamente a diferencia de pacientes o animales sanos o sin tratar en cuya circulación o el tejido hepático no se detectaron fragmentos de este tipo, a pesar de un tratamiento y almacenamiento idénticos, el CPS 1 y sus fragmentos son adecuados para fines diagnósticos. Si para la detección según un procedimiento inmunodiagnóstico en sí conocido se necesitan CPS 1 y sus fragmentos como reactivos o para generar determinados anticuerpos específicos, los fragmentos se fabrican sintéticamente o por tecnología genética como productos de recombinación según procedimientos que se encuentran al estado actual de la técnica.

Además, los fragmentos de CPS 1 necesarios pueden utilizarse también, según procedimientos conocidos del estado moderno de la técnica, para producir anticuerpos monoclonales o policlonales específicos que son adecuados como medios auxiliares para la determinación diagnóstica de los péptidos según la invención y/o también como potenciales remedios terapéuticos. La producción de anticuerpos monoclonales o policlonales apropiados contra secuencias parciales de péptidos conocidas forma parte del estado actual de la técnica.

En la determinación de CPS 1 o fragmentos de CPS 1 en sueros de pacientes puede procederse fundamentalmente del modo descrito, por ejemplo para la determinación selectiva de procalcitonina, en P. P. Ghillani, *et al*., "Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products", The Journal of Immunology, vol. 141, No. 9, 1988, 3156-3163; y P. P. Ghillani, *et al*., "Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases", Cancer research, vol. 49, No. 23, 1989, 6845-6851; remitiéndose de manera expresa y como complemento también a las técnicas de inmunización allí descritas, que constituyen una posibilidad para la obtención de anticuerpos monoclonales también contra secuencias parciales del CPS 1. Las variaciones de las técnicas descritas y/o otras técnicas de inmunización las puede obtener el técnico de obras estándar y publicaciones pertinentes y utilizarlas en consecuencia. Un inmunoensayo preferido para la determinación de CPS 1 en líquidos biológicos humanos, en especial plasma o suero humanos, se describirá a continuación en la parte experimental, junto con los resultados de medición allí obtenidos y la caracterización más precisa de los productos analizados detectados.

Como utilización en el sentido de la presente solicitud debe considerarse también una utilización de CPS 1 o fragmentos de CPS 1 solubles como componentes (reactivos) de un kit de ensayo, o una utilización para producir componentes del ensayo, por ejemplo anticuerpos policlonales o monoclonales que están previstos por lo general también, por ejemplo, en forma inmovilizada y/o marcada en los kits de ensayo.

Hay que citar también de manera expresa la producción de anticuerpos CPS 1 aplicando técnicas de la inmunización genética directa con ADN. Cae dentro del marco de la presente invención utilizar para la inmunización, por ejemplo, un ADNc de CPS 1 o fragmentos del CPS 1 deseado, ya que se ha demostrado en el pasado que mediante las técnicas de inmunización de este tipo se puede ampliar el espectro de anticuerpos que pueden obtenerse.

Se señala además expresamente que en la determinación según la invención de CPS 1 o fragmentos de CPS 1 procedentes de la parte N-terminal de la secuencia de CPS 1, según el diseño del ensayo también puede suceder que se determinen solos o conjuntamente, por ejemplo, otras porciones más largas de CPS 1 soluble que eventualmente estén presentes al mismo tiempo en el líquido biológico y que contienen estos fragmentos, o también formas del CPS 1 completo (que normalmente está localizado en las mitocondrias) presentes en forma soluble. También los procedimientos de este tipo deben entenderse, en el sentido de la presente invención, como procedimientos según la invención para determinar CPS 1 o fragmentos de CPS 1.

Basándose en estos resultados, el CPS 1 según SEQ ID NO: 6 o formas solubles del mismo o péptidos parciales solubles del mismo, por ejemplo los que contienen o están constituidos por una de las secuencias parciales de SEQ ID NO: 1 hasta SED ID NO: 5 y/o otras secuencias parciales del extremo N de CPS 1, pueden servir de péptidos marcadores específicos (biomarcadores) para la detección diagnóstica y para controlar el curso de inflamaciones e infecciones (en particular, como procalcitonina, también de infecciones sistémicas del tipo de la septicemia).

La determinación del CPS 1 en la circulación puede producirse para fines diagnósticos, en determinadas circunstancias también indirectamente como determinación de una actividad enzimática que equivale a la actividad del CPS 1 o la actividad residual de los fragmentos de CPS 1.

Es posible, además, realizar con otros marcadores la determinación de CPS 1 y/o fragmentos de CPS 1 como marcadores pronósticos y marcadores para controlar el curso de la enfermedad de inflamaciones, en especial de inflamaciones sistémicas, y de septicemia en el marco de una medición combinada.

Junto a una combinación con una medición de procalcitonina puede tomarse en consideración especialmente una combinación de la medición de CPS 1 con la determinación de otros marcadores para septicemia e inflamaciones sistémicas, y concretamente en especial con CA 19-9, CA 125, S100B o proteínas S100A partícipes en la regulación de inflamaciones, o con la determinación de los nuevos marcadores de septicemia inflamina (DE 101 19 804.3) y CHP (DE 101 31 922.3), descritos en la solicitud de patente alemana del solicitante de fecha anterior no publicada y que se mencionará más adelante, de la proteína LASP-1 y/o con la determinación de fragmentos solubles de citoqueratina, en especial de los recientemente descubiertos fragmentos solubles de citoqueratina 1 (sCY1F; DE 101 30 985.6) así como los conocidos marcadores de tumores CYFRA-21 o TPS y/o una o más de las prohormonas antes mencionadas. También puede haber prevista una determinación simultánea del conocido parámetro de la inflamación proteína c-reactiva (CRP). Debido a estos nuevos resultados descritos en esta y en otras solicitudes análogas del solicitante, para el diagnóstico fino de la septicemia puede considerarse en general, además, una combinación con mediciones de biomoléculas conocidas o por descubrir que sean adecuadas como marcadores de inflamación específicos de tejidos u órganos.

La determinación de CPS 1 realmente dicha puede producirse de cualquier modo apropiado, en sí conocido, prefiriéndose los inmunensayos de un diseño de ensayo adecuado.

En una forma de realización preferida, la determinación por inmunodiagnosis se realiza como inmunoensayo heterogéneo de tipo sándwich, en el que el anticuerpo se inmoviliza en una fase sólida cualquiera, por ejemplo las paredes de un tubo de ensayo revestidas (por ejemplo de poliestirol; "Coated Tubes"; CT) o en placas de microtitulación, por ejemplo de poliestirol, o en partículas, por ejemplo partículas magnéticas, mientras que el otro anticuerpo lleva un resto que constituye una etiqueta directamente detectable o que permite un enlace selectivo con una etiqueta y que sirve para la detección de las estructuras de tipo sándwich formadas. También es posible una inmovilización posterior o retrasada temporalmente utilizando fases sólidas apropiadas.

Pueden aplicarse fundamentalmente todas las técnicas de marcaje utilizables en los ensayos del tipo citado, entre las que se cuentan los marcajes con radioisótopos, enzimas, etiquetas de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia y marcajes cromáticos detectables ópticamente de manera directa, como por ejemplo átomos de oro y partículas de colorante como los que se utilizan en especial para los llamados Point-of-Care (POC) o tests rápidos. Los dos anticuerpos pueden presentar también, en el caso de inmunoensayos heterogéneos de tipo sándwich, piezas de un sistema de detección del tipo descrito a continuación en relación con los ensayos homogéneos.

Por consiguiente, está dentro del marco de la presente invención configurar el procedimiento según la invención también como test rápido.

El procedimiento según la invención puede configurarse, además, como procedimiento homogéneo en el que los complejos de tipo sándwich formados a partir de los dos anticuerpos y el CPS 1 que hay que detectar permanecen suspendidos en la fase líquida. En un caso de este tipo se prefiere marcar ambos anticuerpos con piezas de un sistema de detección que entonces, cuando ambos anticuerpos se integran en un único sándwich, permite generar o desencadenar una señal. Las técnicas de este tipo pueden configurarse especialmente como procedimientos de detección por intensificación o por atenuación de la fluorescencia. Un procedimiento de este tipo especialmente preferido se refiere a la utilización de reactivos detectores que deben utilizarse por pares, tal como se describen por ejemplo en US-A-4 822 733, EP-B1-180 492 ó EP-B1-539 477 y el estado actual de la técnica allí citado. Permiten una medición, que comprende selectivamente sólo productos de reacción que contienen ambos componentes de marcaje en un único inmunocomplejo, directamente en la mezcla de reacción. Como ejemplo se remite a la tecnología ofrecida bajo las marcas TRACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emisión) o KRYPTOR®, que ponen en práctica las teoría de las solicitudes antes mencionadas.

El contenido de las citadas solicitudes más antiguas del solicitante debe considerarse, tomando referencia expresa a esta solicitudes, como parte de la exposición de la presente solicitud.

La localización e identificación de los fragmentos de CPS 1, así como la determinación de sustancias con la inmunorreactividad de estos fragmentos en la circulación humana, que después resultan ser el enzima CPS 1 al menos esencialmente completo o una forma soluble del mismo, se describirán continuación con más detalles, tomándose como referencia el protocolo de secuencias adjunto. Las figuras muestran:

Fig. 1 Vistas de geles de electroforesis bidimensional que permiten comparar los modelos de spot de proteínas citoplasmáticas de hepatocitos de un papión sano (A) con las proteínas de los hepatocitos de un papión 5h después de una septicemia (B) inducida mediante administración de LPS. La flecha muestra las posiciones de los tres productos específicos de la septicemia según la invención (fragmentos de CPS 1), que en la representación (B) se resaltan mediante un círculo.

Fig. 2 Los resultados de la medición de la inmunorreactividad de CPS 1 en plasmas de personas normales sanas y pacientes con septicemia con un inmunoensayo descrito con más exactitud en la parte experimental, indicando la línea discontinua el límite inferior de detección del test.

Fig. 3 Bandas de Western-Blot de muestras de plasma utilizando antisueros anti-CPS. Se aplicaron (panel A) muestras de personas normales (N1-N3) y pacientes septicémicos (S1-S3). Para la detección de CPS 1 se utilizó una

mezcla de antisueros frente a dos epítopos CPS 1 definidos (Pos. 184-199 y 245-257 del CPS 1 según SEQ ID NO: 6). La especificidad de la reacción se verificó incubando previamente en un segundo planteamiento (panel B) los antisueros con un exceso de péptidos que se habían utilizado para la inmunización o la obtención de antisueros. Se muestran las posiciones de los marcadores de peso molecular.

Fig. 4 Un inmunocromatograma de CPS 1 de una cromatografía de filtración de gel de plasma de septicemia. Se cromatografiaron 100 μl de un plasma septicémico sobre una columna de Bio-Sil SEC-400HPLC. Se recogieron fracciones de 1 ml cada una y se midió la inmunorreactividad CPS-1 de cada una de las fracciones. Se indican las posiciones de estándares de magnitud que se cromatografiaron en una carrera separada.

Parte experimental

1. *Simulación De infección mediante administración de endotoxinas en el modelo animal (papiones)*

Basándose en los ensayos realizados con papiones para estimular el vertido de procalcitonina mediante inyecciones de endotoxinas (véase H. Redl, *et al*., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol. 28. No. 11, 3659-3663; y H. Redl, *et al*., "Non-Human Primate Models of Sepsis", Sepsis 1998; 2:243-253) se administraron por vía intravenosa a papiones (machos, aproximadamente 2 años de edad, 27 a 29 kg de peso) 100 μg LPS (lipopolisacárido de *Salmonella Typhimurium*, fuente de referencia: Sigma) por kg de peso corporal a cada uno. Entre 5 y 5,5 h después de la inyección se sacrificaron los animales inyectándoles por vía intravenosa 10 ml de Doletal. Dentro de los 60 minutos posteriores a su muerte se disecaron todos los órganos/tejidos y se estabilizaron por congelación en nitrógeno líquido.

En el tratamiento posterior se mezclaron muestras de los distintos tejidos ultracongelados (1 g), bajo enfriamiento con nitrógeno, con 1,5 ml de tampón A (50 nM Tris/HCl, pH 7,1, 100 mM KCl, 20% glicerol) y se pulverizaron en un mortero de porcelana hasta convertirlos en harina (véase J. Klose, "Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis", en: Methods in Molecular Biology, Vol. 112: 2-D Proteome Análisis Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ). Después de una posterior centrifugación de 1 hora a 100.000 g y +4ºC, se recogió el sobrenadante obtenido y se almacenó a -80ºC hasta su tratamiento.

Puesto que los ensayos con las muestras anteriormente obtenidas habían dado por resultado que las mayores cantidades de procalcitonina se encontraran en el tejido hepático de animales tratados, para buscar nuevos biomarcadores específicos de la septicemia se trabajó con extractos de proteína procedentes de hígado de papión.

2. *Análisis de proteoma utilizando proteínas citoplasmáticas de hepatocitos de papiones*

Dentro del marco de un análisis del proteoma se utilizaron extractos de proteína citoplasmática de hepatocitos de papiones sanos (controles) por un lado y por otro lado de papiones a los que se había inyectado LPS. En la electroforesis bidimensional preliminar de análisis en gel se ajustó extracto de hígado conteniendo 100 μg de proteína con 9M urea, 70 mM DTT y 2% Ampholyt pH 2-4, y después se separó mediante electroforesis bidimensional de análisis en gel tal como se describe en J. Klose, *et al*. "Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome", Electrophoresis 1995, 16, 1034-1059. La visualización de la proteína en el gel de electroforesis bidimensional se realizó mediante tinción con plata (véase J. Heukeshoven, *et al*., "Improved silver staining procedure for fase staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels", Electrophoresis 1988, 9, 28-32.

Para la evaluación se compararon las muestras de spot de proteínas de las muestras de animales sin tratar con las muestras de spot de proteínas resultantes de las muestras de tejido hepático de animales tratados. Para más estudios analíticos se seleccionaron sustancias que no aparecían en ninguna muestra de control pero sí en todos los animales tratados. La Figura 1 muestras una comparación de los geles de electroforesis bidimensional para una muestra de control (A) y una muestra de un animal tratado (B), destacándose mediante una flecha y un círculo tres spots adicionales de proteína en (B) con masas molares de aproximadamente 68 kDa, 69 kDa y 70 kDa (± 3 kDa) y puntos isoeléctricos de aproximadamente 6,0, 5,8 y 5,6 respectivamente.

Las nuevas proteínas específicas identificadas en las muestras de spots de proteína de la electroforesis bidimensional en gel se prepararon después por medio de electroforesis bidimensional en gel preparativa, utilizando 350 μg de proteína (véase de nuevo (10)). En la electroforesis bidimensional en gel preparativa la tinción se realizó por medio de Coomassie Brilliant Blue G250 (véase Neuhoff, *et al*., "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G250 and R-250", Electrophoresis 1988, 9, 255-262).

Los spots de proteína preseleccionados para el análisis posterior se recortaron del gel.

Utilizando los métodos descritos en A. Otto, *et al*., "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", Electrophoresis 1996, 17, 1643-1650, se digirieron con tripsina los spots de proteína y después se analizaron mediante espectromicroscopía de masas empleando análisis espectrométricos de masas tal como se describen y discuten, por ejemplo, en G. Neubauer, *et al*., "Mass spectrometry and EST-databases searching allows characterization of the multi-protein spliceosome

complex", en: nature genetics vol. 20, 1998, 46-50; J. Lingner, *et al*., "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", en: Science, Vol. 276, 1997, 561-567; M. Mann, *et al*., "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases", en: TRENDS in Biochemical Sciences, Vol. 26, 1, 2001, 54-61.

Fragmentos de la digestión con tripsina de los tres spots de proteína se sometieron, después de un ESI (ElectroSprayIonisierung), también a una espectrometría de masas en tándem. Se utilizó un espectrómetro de masas Q-TOF con una fuente de iones denominada nanoflow-Z-Spray de la empresa Micromass, R.U. Se trabajó conforme a las instrucciones de trabajo del fabricante del aparato.

3. *Identificación de fragmentos CPS 1*

Tal como se muestra en las Figuras 1(A) y 1(B), en los extractos de hepatocitos de papiones a los que se administró una inyección de LPS se encuentran, entre otros, tres nuevos spots de proteína para los que se estimaron, basándose en los datos de la electroforesis en gel comparados con sustancias marcadoras de peso molecular conocido, pesos moleculares de aproximadamente 68 kDa, 69 kDa y 70 kDA (± 3 kDa), mientras que a partir de la posición relativa de las proteínas procedentes de la primera dimensión se calcularon puntos isoeléctricos correspondientes de aproximadamente 6,0, 5,8 y 5,6 respectivamente, es decir, puntos isoeléctricos en el rango de aproximadamente 5,5 a 6,1.

Estas proteínas se analizaron mediante espectrometría de masas del modo anteriormente descrito.

A partir de los "espectros madre" de las tres proteínas digeridas con tripsina se identificaron fragmentos individuales ("tags") mediante espectroscopia de masas en tándem. Los espectros de masa obtenidos para estos fragmentos pudieron evaluarse aritméticamente de un modo en sí conocido y dieron los siguientes resultados (desde el punto de vista de la espectrometría de masas no es posible diferenciar entre los aminoácidos leucina (L) e isoleucina (I) así como entre los aminoácidos lisina (K) y glutamina (Q); las secuencias siguientes tienen en consideración, por lo tanto, la asignación al espectro conocido del CPS 1 completo según SEQ ID NO: 6):

Spot de proteína a 70 kDa (± 3 kDa):

Fragmento 70/1:	GQNQPVLNITN	(SEG ID NO: 1)
Fragmento 70/2:	NQPVLNI	(SEG ID NO: 2)
Fragmento 70/3:	AQTAHIVLEDGTK	(SEG ID NO: 3)

Spot de proteína a 69 kDa (± 3 kDa):

Fragmento 69/1:	GQNQPVLNITN	(SEG ID NO: 1)
Fragmento 69/2:	TAHI	(SEG ID NO: 4)

Spot de proteína a 68 kDa (± 3 kDa):

Fragmento 68/1:	NQPVLNI	(SEG ID NO: 2)
Fragmento 68/2:	AFAMTNQILVEK	(SEG ID NO: 5)

Las anteriores secuencias parciales según SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5 pudieron identificarse como secuencias parciales de la secuencia del CPS 1 humano, que se encuentra en NiceProt View of SWISS PROT: P31327, con una cadena de aminoácidos de una longitud de 1500 aminoácidos y una correspondiente masa molar aritmética (sin tener en cuenta eventuales modificaciones posteriores a la traducción) de 164,939 kDa (SEQ ID NO: 6). Se obtuvo la siguiente asignación de los péptidos parciales:

SEQ ID NO: 1	aminoácidos 317 - 327
SEQ ID NO: 2	aminoácidos 319 - 325
SEQ ID NO: 3	aminoácidos 43 - 55
SEQ ID NO: 4	aminoácidos 45 - 48
SEQ ID NO: 5	aminoácidos 613 - 624

Los aminoácidos encontrados abarcan una sección desde los aminoácidos 43 a los aminoácidos 624, es decir, una parte esencial de la porción amino-terminal del CPS 1.

Completando habría que señalar que las secuencias encontradas no pueden asignarse al enzima citosólico CPS 2 emparentado.

4. *Determinaciones de la inmunoreactividad de CPS 1 en plasmas humanos de personas normales sanas y pacientes septicémicos*

4.1 *Material y métodos*

4.1.1. *Síntesis peptídica*

Deducido a partir de la secuencia de aminoácidos conocida del CPS 1 humano se eligieron dos zonas (Pos. 184-199: zona 1 del péptido; SEQ ID NO: 7; Pos. 245-257: zona 2 del péptido; SEQ ID NO: 8). Completado cada uno en un resto de cisteína N-terminal, ambas zonas se sintetizaron químicamente como péptidos solubles según procedimientos estándar, se depuraron, se controló su calidad mediante espectrometría de masas y Reversed Phase HPLC y se liofilizaron en alícuotas (empresa JERINI AG, Berlín, Alemania). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos son:

Péptido PCEN17:	CEFEGQPVDFVDPNKQN	SED ID NO: 7
Péptido PCVD14:	CVPWNHDFTKMEYD	SED ID NO: 8

El material estándar recombinante se obtuvo de la empresa *In Vivo* GMBH (Henningsdorf, Alemania). Se trataba de un extracto celular crudo de una cepa de *E. coli*, que exprimió la zona N-terminal recombinante de CPS 1 humano (Pos. 1-640 de SEQ ID NO: 6), completado en un strep-tag N-terminal. Se atribuyó al extracto una concentración arbitraria de CPS 1.

4.1.2 *Conjugación e Inmunización*

Mediante MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) se conjugaron los anteriores péptidos PCEN17 y PCVD14 en la proteína portadora KLH (Keyhole limpet hemocyanin) (véanse las instrucciones de trabajo "NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers", empresa PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.). Con estos conjugados se inmunizaron ovejas según el siguiente esquema: cada oveja recibió inicialmente 100 μg de conjugado (los datos sobre masas se refieren a la porción de péptido del conjugado) y a continuación 4 veces por semana 50 μg de conjugado (los datos sobre masas se refieren a la porción de péptido del conjugado). Comenzando el cuarto mes después del inicio de la inmunización se extrajeron a cada oveja 4 veces por semana 700 ml de sangre y de ellas se obtuvo antisuero por centrifugación. Las conjugaciones, las inmunizaciones y la obtención de antisueros los realizó la empresa MicroPharm, Carmarthenshire, R.U.

4.1.3 *Depuración de los anticuerpos*

En un procedimiento de 1 paso se prepararon los anticuerpos específicos del péptido que se habían obtenido partiendo del cuarto mes después de la inmunización.

Primero se acoplaron los péptidos PCEN17 y PCVD14 a gel Sulfo-Link (véanse las instrucciones de trabajo "SulfoLink Kit", empresa PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.). Para cada uno de los acoplamientos se utilizaron 5 mg de péptido por cada 5 ml de gel.

La depuración por afinidad de anticuerpos específicos del péptido a partir de antisueros de oveja frente a ambos péptidos, se realizó de la siguiente manera:

Las columnas de péptido se lavaron tres veces de manera alterna con 10 ml de tampón de elución (50 mM ácido cítrico, pH 2.2) y de tampón de enlace (100 mM fosfato sódico, 0,1% Twenn, pH 6.8). Se filtraron 100 ml de los antisueros por 0,2 μm y se mezclaron con el material existente en las columnas. Se lavó entonces cuantitativamente el gel con 10 ml de tampón de enlace procedente de la columna. La incubación se realizó durante la noche a temperatura ambiente y con basculamiento. Los preparados se llevaron cuantitativamente a columnas vacías (NAP 25, Pharmacia, vaciados). Se eliminaron las cantidades pasadas. Finalmente se lavó con 250 ml de tampón de enlace para eliminar cualquier proteína (contenido en proteínas del eluado de lavado < 0,02 A280 nm). En las columnas lavadas se añadió tampón de elución y se recogieron fracciones de 1 ml cada una. De cada fracción se determinó el contenido en proteína mediante el método BCA (véanse las instrucciones de trabajo, empresa PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.). Se hizo un pool con las fracciones con una concentración de proteían> 0,8 mg/ml. Después de la determinación de la proteína del pool resultaron por el método BCA rendimientos de 27 mg para el anticuerpo anti-PCEN17 y 33 mg para el anticuerpo anti-PCVD14.

4.1.4 *Marcado*

A través de una columna de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) se cambió el tamponado de 500 μl del anticuerpo anti-PCEN17 depurado (véase arriba) en 1 ml de 100 mM tampón de fosfato potásico (pH 8.0) según las instrucciones de trabajo. La determinación de la concentración de proteína de la solución de anticuerpos dio un valor de 1,5 mg/ml.

Para el marcado con quimioluminiscencia del anticuerpo se mezclaron 67 μl de la solución de anticuerpos con 10 μl de MA70-Akridinium-NHS-Ester (1 mg/ml; empresa HOECHST Behring) y se incubaron 15 minutos a tempera-

tura ambiente. Se añadieron después 423 μl de 1 M glicina y se incubó otros 10 minutos. Finalmente se cambió el tamponado del preparado de marcado a través de una columna de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) en 1 ml de medio de paso A (50 mM fosfato potásico, 100 mM NaCl, pH 7.4) según las instrucciones de trabajo y se eliminaron los componentes de bajo peso molecular. Para separar los últimos restos de etiquetas no ligadas a anticuerpos se realizó una HPLC-filtración en gel (columna: Waters Protein Pak SW300). Se aplicó la muestra y se cromatografió a una velocidad de flujo de 1 ml/min con medio de paso A. Con un fotómetro de flujo se midieron las longitudes de onda 280 nm y 368 nm. La proporción de absorción 368 nm/280 nm como medida del grado de marcaje del anticuerpo fue de 0.10 en el pico. Se recogieron las fracciones conteniendo anticuerpos monómeros (tiempo de retención 8-10 min) y se reunieron en 3 ml de fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, 5% de Bovines FERUM Albumin, 0,1% azida de sodio, pH 7.4.

4.1.5 *Acoplamiento*

Tubos de ensayo de poliestirol de 5 ml irradiados (empresa Graiger) se revistieron de la siguiente manera con anticuerpo anti-PCVD14 purificado: se diluyeron los anticuerpos en 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH7,8 hasta una concentración de 6.6 μg/ml. En cada tubo se pipetearon 300 μl de esta solución. Se incubaron los tubos durante 20 horas a 22ºC. Se aspiró la solución. Después se llenó cada tubo con 4.2 ml de fosfato sódico 10 mM, 2% Karion FP, 0,3% Bovines Serum Albumin, pH 6.5. Después de 20 horas se aspiró la solución. Finalmente se secaron los tubos en una estufa de vacío.

4.2 *Realización y valoración del inmunoensayo*

4.2.1 *Configuración del ensayo*

Se elaboró un tampón de ensayo de la composición siguiente:

100 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, 5% Bovines Serum Albumin, 0,1% IgG de oveja inespec., 0,1% azida de sodio, pH 7.4.

Como material estándar sirvió CPS 1 humano recombinante exprimido en *E. coli* en forma de un extracto crudo de *E. coli*, conteniendo la totalidad de la proteína intracelular soluble. Este extracto se diluyó de manera seriada en suero normal de caballo (empresa SIGMA). Al estándar así obtenido se le atribuyeron concentraciones arbitrarias según su dilución.

4.2.2 *Medición de plasmas EDTA de personas aparentemente sanas y de pacientes con septicemia.*

En cada uno los tubos de ensayo arriba mencionados se pipetearon 50 μl de estándar o de la muestra así como 200 μl de tampón de ensayo. Se incubó durante 18 horas a 22ºC con agitación. Después se lavó 4 x con 1 ml de solución de lavado (0,1% Tween 20) por cada tubo. Se pipetearon después en cada tubo 200 μl de tampón de ensayo conteniendo 0,5 millones de RLU del anticuerpo trazador marcado con MA70. Se incubó durante dos horas a 22ºC con agitación. Después se lavó 4 x con 1 ml de solución de lavado (0,1% Tween 20) por cada tubo, se dejó escurrir y la quimioluminiscencia ligada a cada tubo se midió en un luminómetro (empresa BERTHOLD, LB952T; reactivos básicos BRHMS AG).

Utilizando el software MultiCalc (Spline Fit) se leyó la concentración en la inmunorreactividad CPS 1. Los resultados se muestran en la Figura 2. Se observa una clara diferencia entre las personas sanas y los pacientes de septicemia.

5. *Análisis Western Blot de plasmas*

Para una caracterización molecular más precisa de la inmunorreactividad CPS 1 en plasmas de septicemia se analizaron muestras de plasmas de este tipo mediante la técnica Western Blot.

5.1 *Fabricación del gel*

Se fundió un gel separador SDS al 7,5% para una PROTEAN II xi Cell (empresa BIO-RAD) según las instrucciones de la empresa Bio-Rad:

11,25 ml 1 M Tris pH 8,8

+ 7,5 ml 30% Acrilamida/bisacrilamida (29:1), empresa Biorad

+ 10,79 ml Milli-Q-Wasser

+ 300 μl 10% SDS

+ 150 μl 10% APS

+ 15 μl TEMED

Tras aplicar encima una capa de agua y polimerizar, se fundió un gel colector SDS al 5% de la siguiente manera:

1,25 ml 1 M Tris pH 6,8

+ 1,33 ml 30% Acrilamida/bisacrilamida (29:1), empresa Biorad

+ 7,26 ml Milli-Q-Wasser

+ 100 μl 10% SDS

+ 50 μl 10% APS

+ 10 μl TEMED

Se pipetaron 5 ml de la solución de gel colector sobre el gel separador, se montó el peine y se dejo polimerizar.

5.2. *Electroforesis en gel*

5 μl de muestras de plasma EDTA de cada una de tres personas de control sanas y tres pacientes de septicemia se mezclaron con 20 μl PBS, 2,5 μl de glicerina y 5 μl de Cracking buffer (120 mM Tris/HCl, pH 6,4, 2% SDS, 20% glicerina, 20% β-mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol), se incubaron 10 minutos a 90ºC y después se aplicaron. Como marcadores de peso molecular se aplicaron 10 μl de Rainbow Marker RPN 756 (empresa Pharmacia).

Como cámara se utilizó una PROTEAN II xi Cell (empresa BIO-RAD). El tampón de electroforesis fue: 25 mM Tris/HCl, 90 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,6. Las condiciones de electroforesis fueron: 45 min a 46V/16 mA, 30 min a 120 V/50 mA, 150 min a 150V/56 mA, 90 min a 190 V/45 mA.

Como tampón de Blot se utilizó: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 1% SDS, 20% metanol, pH 8,3. La lámina Blot fue lámina Blot de nitrocelulosa Protran BA83, 13 x 13 cm (empresa Schleicher & Schuell). El aparato de Blot fue un Semi-Dry-Blotter (modelo Pegasus de la empresa Phase).

Se incubó el gel 10 min en tampón Blot, se aplicó sobre la lámina Blot y se recubrió con varias capas de papel cromatográfico Whatman 3MM (empapadas en tampón Blot). Después se aplicó la técnica Blot (0,8 mA/cm^2 de superficie del gel, 70 min).

5.4 *Reacción inmune*

La lámina Blot se saturó en 150 ml PBS-Tween-solución de proteína (PBS, 0,3% Tween, 1,5% BSA, 50 μg/ml IgG de ratón inespec.) durante la noche a 4ºC con agitación. Se añadieron a la solución 30 μl de antisuero de oveja anti PCEN17 o anti PCVD14 (fabricación del antisuero, véase anteriormente) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Se decantó la solución y se lavó con agitación la lámina Blot 4 x 10 min en 300 ml PBS-Tween-solución de proteína. Se añadió después el anticuerpo secundario: 30 μl de conjugado de IgG antioveja de ratón monoclonal-fosfatasa alcalina (empresa Sigma, A8062), diluido en 150 ml de PBS-Tween-solución de proteína. Se incubó durante 90 minutos con agitación a temperatura ambiente. Se decantó a continuación y se lavó con agitación durante 10 min con 150 ml de PBS-Tween-solución de proteína. Después se decantó y se lavó con agitación 2 x 10 min con 150 ml de tampón de lavado (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl).

Se fabricó la solución de sustrato de la siguiente manera: 100 ml de tampón revelador (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl2) + 350 μl de una solución de 50 mg BCIP (5-bromo-4-cloro-3 indolilfosfato, empresa Sigma) por ml 100% dimetilformamida, + 450 μl de una solución de 100 mg NBT (Nitro blue tetrazolium, empresa Sigma) por ml 70% dimetilformamida.

La solución de sustrato se aplicó sobre una lámina Blot. Después de 5 minutos se finalizó la reacción de tinción lavando la lámina Blot en agua. Los resultados se muestran en la Figura 3 (panel A).

En un planteamiento paralelo se añadieron a la solución con los antisueros primarios (antisuero de oveja anti PCEN17 o anti PCVD14) los correspondientes péptidos inmunogénicos PCEN17 y PCVD14 en una concentración final de 2 μg/ml y se hizo una incubación previa de 30 min. Los resultados se muestran en la Figura 3 (panel B), tomándose referencia expresa a las leyendas de esta Figura 3.

6. *HPLC-filtración en gel de plasma de septicemia*

Para determinar el peso molecular aparente de la inmunorreactividad CPS 1 a partir de plasma de septicemia en solución se fraccionó un plasma de este tipo mediante una HPLC-filtración en gel y se midió la inmunorreactividad CPS1 en las fracciones. Se calibraron las columnas mediante una cromatografía por separado de estándares (Bio-Rad-Standard: Cat.No. 151-1901). Se utilizó una columna Bio-Sil SEC-400 (7,8x300 mm Ser.No. 415949) de la empresa Bio-Rad. El medio de paso fue 300 mM fosfato potásico, 0,1% NaN_3, pH 7,0. Del plasma de septicemia se cromatografiaron 100 μl, se recogieron fracciones de 1 ml y cada 50 μl de ellas se midieron en inmunoensayo (realización, véase

anteriormente). Los resultados obtenidos (reactividad/fracción) se representan en la Figura 4, tomándose referencia expresa a las leyendas de esta Figura 4.

Los resultados de las mediciones de la inmunorreactividad CPS 1 en plasmas humanos o los análisis sobre especies responsables de la inmunorreactividad observada, se pueden resumir de la siguiente manera:

Mediante el inmunoensayo sandwich descrito se demostró que los plasmas de pacientes septicémicos presentan concentraciones fuertemente elevadas de inmunorreactividad CPS 1, mientras que en los plasmas de personas sanas no se detectó CPS 1 (Figura 2).

La inmunorreactividad CPS 1 circulante en los plasmas septicémicos evidentemente consiste en esencia en el enzima CPS 1 intacto o una forma del mismo con mayor solubilidad:

Tres plasmas septicémicos analizados mostraron en el Western-Blot una banda CPS específica en aproximadamente 150 kDa (Fig. 3). Esto equivale aproximadamente al peso molecular de unos 160 kDa calculados para el CPS 1 intacto basándose en la secuencia de aminoácidos conocida.

La HPLC-filtración en gel mostró que la inmunorreactividad CPS 1 del plasma de septicemia analizado en la solución presenta un peso molecular de aproximadamente 200 kDa (+/- 50 kDa) (Figura 4).

La medición de CPS 1 en plasma/suero humano no se ha descrito hasta la fecha, ni para pacientes con septicemia ni para otros agentes patológicos. Únicamente en un modelo experimental con ratas para la hepatitis aguda se midió el CPS 1 en plasma (véase anteriormente Ozaki *et al*., 1996). Sin embargo, las condiciones con ratas no son comparables evidentemente a las de los seres humanos, puesto que en las citadas publicaciones para los animales sanos se detectaron ya concentraciones de CPS de 1-2 μg/ml, mientras que las mediciones descritas de plasmas humanos de personas sanas del solicitante dieron valores por debajo del límite de detección (estimado aproximadamente en 0,5 ng/ml).

Sorprendentemente, para los pacientes de septicemia se demostró un aumento masivo de la inmunorreactividad CPS 1 en plasma. Se sabe que en la septicemia se produce una lesión de las mitocondrias (Crouser ED *et al*., Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity; Crit Care Med. 2002 Feb; 30(2): 276-84). Una lesión de este tipo en relación con necrosis o apoptosis podría ser la causa del paso de CPS 1 desde la matriz mitocondrial hacia la circulación sanguínea. Ya que el CPS 1 se exprime casi exclusivamente en el hígado y constituye allí una parte notable del total de la proteína soluble, la medición del CPS 1 podría ser especialmente apropiada para mostrar lesiones del hígado en caso de septicemia severa u otras condiciones, por ejemplo en el marco de un fallo multiorgánico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para el reconocimiento precoz y el reconocimiento mediante diagnóstico diferencial, para el pronóstico del curso y la evaluación del grado de severidad y la evaluación del curso del tratamiento concomitante de la septicemia, **caracterizado** porque se determina en la circulación de un paciente humano la presencia y/o la cantidad de carbamoilfostato sintetasa 1 (CPS 1) y a partir de la detección y/o la cantidad de CPS 1 se extraen conclusiones con respecto a la existencia del curso esperado, del grado de severidad de la septicemia o del éxito de su tratamiento terapéutico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las secuencias de CPS 1 utilizadas en la determinación son secuencias de fragmentos de una parte N-terminal del CPS 1 que comprende los aminoácidos 1 hasta aproximadamente 630 de la secuencia completa de CPS 1 (SEQ ID NO: 6).

3. Procedimiento según las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado** porque la inmunorreactividad CPS 1 determinada puede asignarse como mínimo parcialmente a componentes del plasma con una masa molar de 200 kDa ± 50 kDa determinada mediante electroforesis en gel, y/o a componentes con una masa molar de 68 a 70 kDa ± 3 kDa y puntos isoeléctricos en un dominio de 5,5 a 6,1.

4. Procedimiento según unas de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las secuencias de CPS 1 utilizadas con fines de ensayo contienen como mínimo 2 secuencias parciales de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

5. Procedimiento según unas de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque es un procedimiento de determinación inmunodiagnóstico.

6. Procedimiento según unas de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la determinación de los CPS 1 solubles se produce como determinación de la actividad enzimática de CPS 1 en sangre, plasma sanguíneo o suero.

7. Procedimiento según unas de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque se realiza para el diagnóstico de septicemia dentro del marco de una determinación multiplarámetros, en la que se determina al menos otro parámetro de septicemia y se obtiene un resultado de medición en forma de una expresión de cómo mínimo dos magnitudes de medición, que se valora para el diagnóstico fino de la septicemia.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque en el marco de la determinación multiparámetros, junto a como mínimo un fragmento de CPS 1, se determina como mínimo un parámetro más que se elige del grupo formado por procalcitonina, CA 19-9, CA 125, S100B, proteínas S100A, fragmentos de citoqueratina solubles, en especial CYFRA 21, TPS y/o fragmentos de citoqueratina-1 soluble (sCY1F), los péptidos inflamina, CHP, LASP-1 y la inmunorreactividad péptido-prohormona y la proteína c-reactiva (CRP).

9. Procedimiento según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque la determinación multiparámetros se realiza como determinación simultánea por medio de un dispositivo medidor de tecnología de chips o un dispositivo medidor de inmunocromatografía.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la evaluación de los resultados de medición complejos obtenidos con el dispositivo medidor se realiza con ayuda de un programa de ordenador.

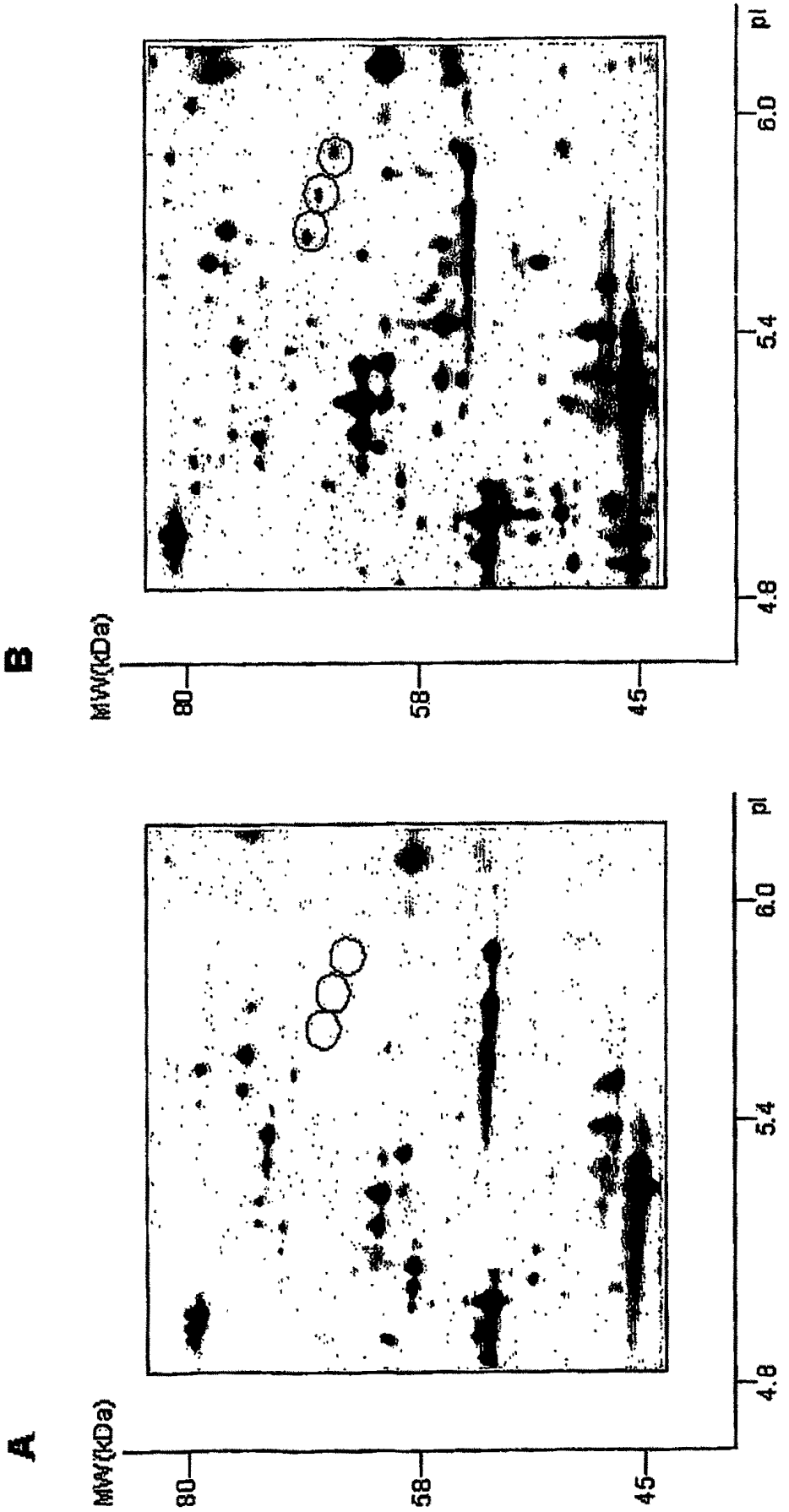


Fig. 1

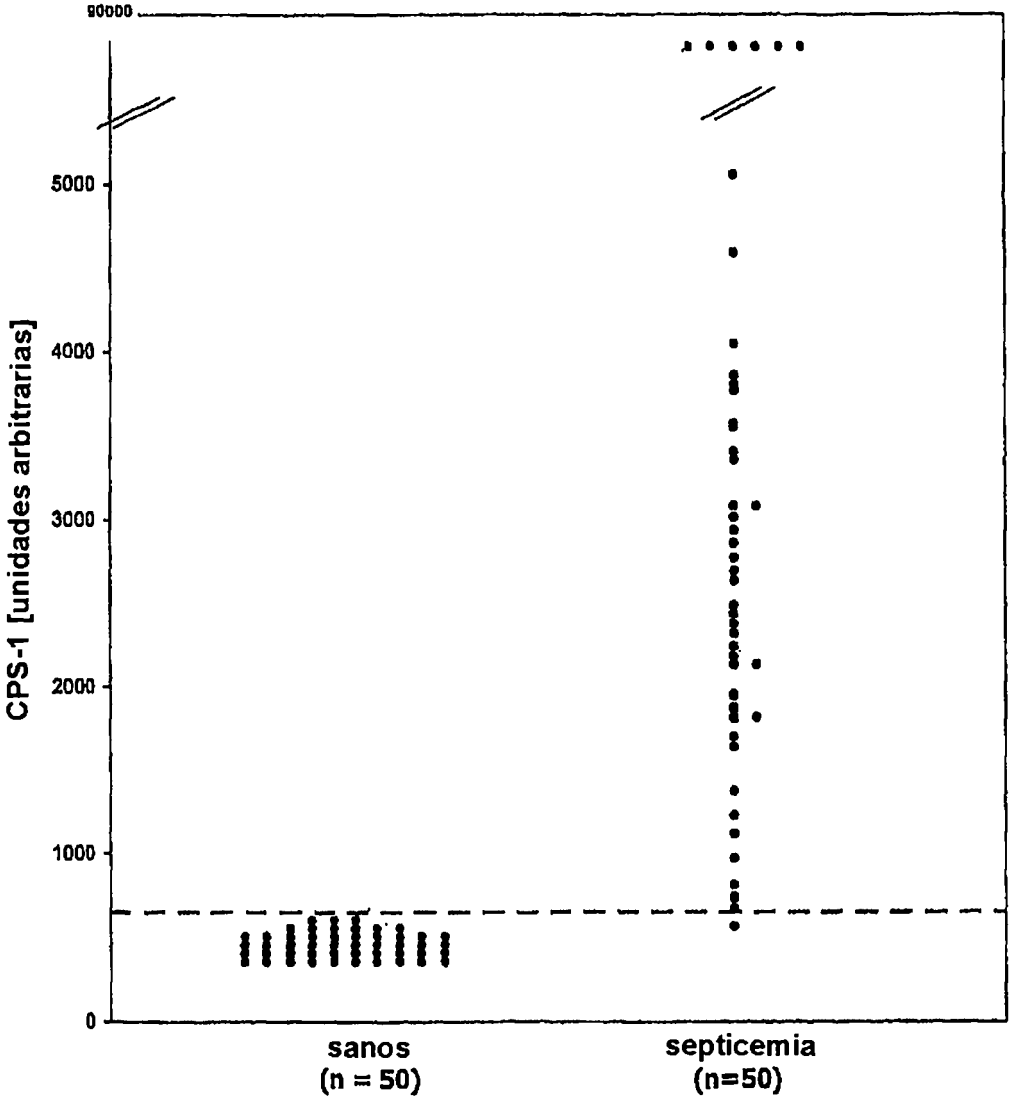

90000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CPS-1 [unidades arbitrarias]
sanos
(n = 50)
septicemia
(n=50)

Fig. 2

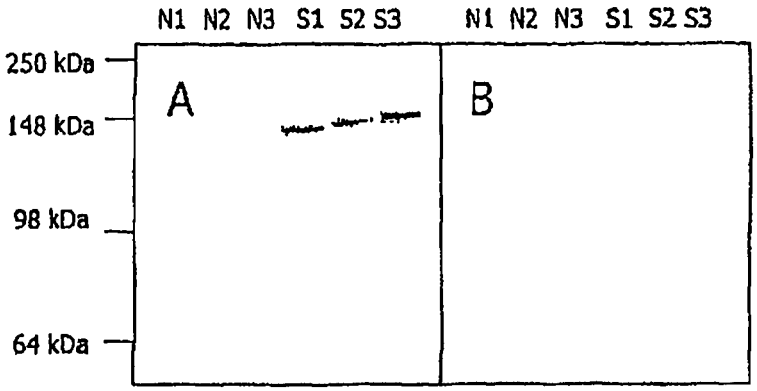


Fig. 3

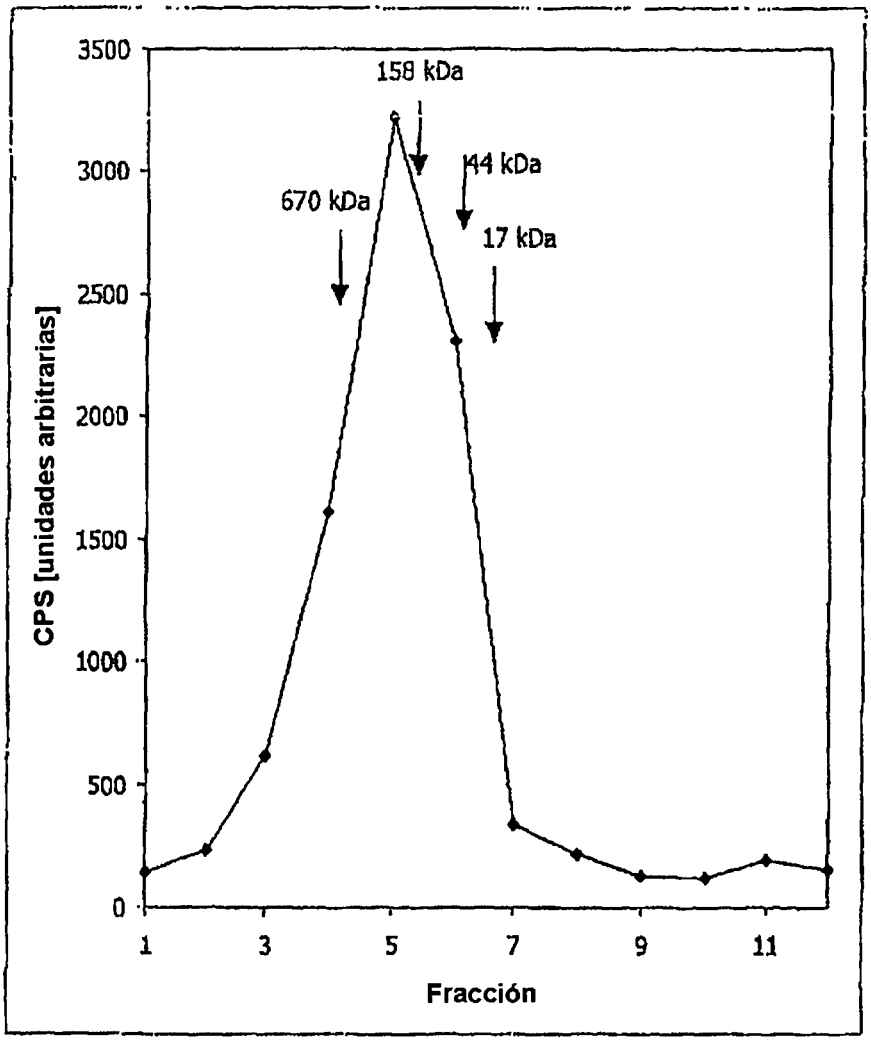

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
CPS [unidades arbitrarias]
158 kDa
44 kDa
670 kDa
17 kDa
1
3
5
7
9
11
Fracción

Fig. 4

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> Verwendungen der Carbamoylphosphat Synthetase 1 (CPS 1) und ihrer Fragmente für die Diagnose von Entzündungserkrankungen und Sepsis

<130> 3695PCT AS

<140>

<141>

<150> 02008841.5 EP

<151> 2002-04-19

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Primat (Pavian)

<400> 1

Gly Gln Asn Gln Pro Val Lau Asn Ile Thr Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Primat (Pavian)

<400> 2

Asn Gln Pro Val Leu Asn Ile
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Primat (Pavian)

<400> 3

Ala Gln Thr Ala His Ile Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys
1 5 10

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Primat (Pavian)

<400> 4

Thr Ala His Ile
1

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)

<400> 5

Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Lau Val Glu Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 1500
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
Met Thr Arg Ile Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys Thr
 1               5                  10                  15

Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe Ser
            20                  25                  30

Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His Ile
        35                  40                  45

Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His Pro
    50                  55                  60

Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly Tyr
65                  70                  75                  80

Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr Met
                85                  90                  95

Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala Leu
            100                 105                 110

Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys Val
        115                 120                 125

Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp Leu
    130                 135                 140

Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro Ala
145                 150                 155                 160

Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp Lys
                165                 170                 175

Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe
            180                 185                 190

Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys Asp
        195                 200                 205

Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val Asp
    210                 215                 220

Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly Ala
225                 230                 235                 240

Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu Tyr
                245                 250                 255

Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala Glu
            260                 265                 270
```

Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys Glu
275 280 285

Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala Ala
290 295 300

Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn Gln
305 310 315 320

Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln Asn
325 330 335

His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro Leu
340 345 350

Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu Ser
355 360 365

Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly Pro
370 375 380

Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys Lys
385 390 395 400

Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu Val
405 410 415

Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly Gly
420 425 430

Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln Ala
435 440 445

Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn Pro
450 455 460

Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala Asp
465 470 475 480

Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val Ile
485 490 495

Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln Thr
500 505 510

Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys Glu
515 520 525

Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala Thr
530 535 540

Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys
545 550 555 560

Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys Ala
565 570 575

Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala Leu
580 585 590

Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met Asp
595 600 605

Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu Lys
610 615 620

Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp Ala
625 630 635 640

Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala Met
645 650 655

Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr Leu
660 665 670

Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val Val
675 680 685

Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu His
690 695 700

Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu Ser
705 710 715 720

Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Phe
725 730 735

Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys Asn
740 745 750

Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp Tyr
755 760 765

Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly Thr
770 775 780

Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met Ala
785 790 795 800

Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met Cys
805 810 815

His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys Glu
820 825 830

Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser Ser
835 840 845

Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser Leu
850 855 860

Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr Lys
865 870 875 880

Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn Ser
885 890 895

Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly Phe
900 905 910

Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln Thr
915 920 925

Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln Ile
930 935 940

Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr Val
945 950 955 960

Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly Met
965 970 975

Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu Phe
980 985 990

Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly Lys
995 1000 1005

Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp Phe
1010 1015 1020

Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg Ile
1025 1030 1035 1040

Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser Val
1045 1050 1055

Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn Gly
1060 1065 1070

Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu Asp
1075 1080 1085

Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln Ala
1090 1095 1100

Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala Lys
1105 1110 1115 1120

Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser Gly
1125 1130 1135

Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe Leu
1140 1145 1150

Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr Lys
1155 1160 1165

Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys Asp
1170 1175 1180

Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala Gly
1185 1190 1195 1200

Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile Ser
1205 1210 1215

Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala Lys
1220 1225 1230

Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys Gly
1235 1240 1245

Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser Phe
1250 1255 1260

Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala Thr
1265 1270 1275 1280

Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr Leu
1285 1290 1295

Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro Met
1300 1305 1310

Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys Glu
1315 1320 1325

```
Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His Thr
   1330                1335                1340

Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln Lys
1345                1350                1355                1360

Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu Gly
                1365                1370                1375

Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr Glu
            1380                1385                1390

Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Thr Pro Val
        1395                1400                1405

Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile Arg
   1410                1415                1420

Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro Asn
1425                1430                1435                1440

Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr Ala
                1445                1450                1455

Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys Leu
            1460                1465                1470

Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser Leu
        1475                1480                1485

Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
   1490                1495                1500
```

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7

```
Cys Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe Val Asp Pro Asn Lys Gln
1               5                  10                  15
Asn
```

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 8

```
Cys Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu Tyr Asp
1               5                  10
```