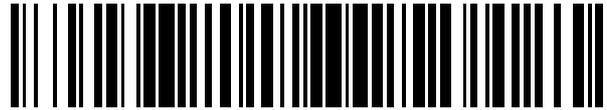


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 994**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 10718654 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2430453**

54 Título: **cMyBP-C y MLC2 como marcadores de diagnóstico de lesión cardiaca**

30 Prioridad:

11.05.2009 GB 0908071

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

19.01.2015

73 Titular/es:

**KING'S COLLEGE LONDON (100.0%)
London WC2R 2LS, GB**

72 Inventor/es:

**MAYR, MANUEL;
JACQUET, SEBASTIEN;
MARBER, MICHAEL y
GAUTEL, MATHIAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 526 994 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

cMyBP-C y MLC2 como marcadores de diagnóstico de lesión cardíaca

Campo de la invención

5 La invención se refiere a marcadores para infarto agudo de miocardio (IAM), en particular a marcadores que se pueden usar en el diagnóstico rápido y preciso de AMI o recidiva de infarcto.

Antecedentes de la invención

10 El infarto agudo de miocardio (IAM) es una causa común de muerte para la que existen tratamientos efectivos disponibles siempre que la afección se diagnostique rápidamente. El diagnóstico de módem del IAM se basa en el ascenso y caída de un biomarcador específico de suero acompañado por una circunstancia apropiada, tal como dolor en el pecho o revascularización. En este paradigma aceptado, el diagnóstico no se puede admitir o descartar sin la presencia definitiva o ausencia definitiva de un biomarcador de suero. El biomarcador ideal de lesión cardíaca debe ser específico del corazón y liberarse rápidamente después de la lesión miocárdica en proporción directa a la magnitud de los daños. Además, el biomarcador debe tener una alta sensibilidad y especificidad. (1) Se han descrito varios biomarcadores de IAM en la bibliografía, pero sólo unos pocos han encontrado su camino en la práctica clínica habitual de los cuales ninguno es ideal. Por ejemplo, la CK-MB comienza a aumentar de 4 a 8 horas después de la oclusión de la arteria coronaria y vuelve a los valores basales en 2 - 3 días. (2) Sin embargo, su uso está limitado por su presencia en el músculo esquelético y el suero normal y por la sensibilidad del ensayo a la interferencia que produce que se cuestione su utilidad. (3) La mioglobina es otra proteína citoplasmática que se encuentra en el músculo cardíaco y esquelético, pero no en el liso. Se libera incluso antes, en 1 - 2 horas del IAM y picos en 5 a 6 horas. (2) Por desgracia, cualquier lesión en el músculo esquelético también hace que los niveles elevados de mioglobina reduzcan la especificidad. Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) son pequeñas proteínas citoplasmáticas (15 kDa) expresadas en todos los tejidos con metabolismo activo de los ácidos grasos. Entre las nueve proteínas, la FABP específica del corazón (H-FABP) se encuentra en el corazón, pero también en el riñón, en el cerebro, en el músculo esquelético y en la placenta. (4) Después del IM agudo se puede detectar la H-FABP en 20 minutos y picos a las 4 horas considerablemente más rápido incluso que la CK / CK-MB en la misma cohorte de pacientes. Aunque las concentraciones de H-FABP en plasma normal son bajas se sabe que aumentan de forma no específica durante el esfuerzo físico (sin un aumento de troponina), lesión renal y accidente cerebrovascular. (5)

30 Las proteínas cardíacas más específicas y sensibles liberadas después del infarto agudo de miocardio son la troponina cardíaca I y T. Tanto la troponina I como la T se liberan lentamente, alcanzando un máximo aproximadamente 18 horas después de un IM, y siguen siendo elevadas durante 7 a 10 días. (2) Es probable que esta liberación lenta sea el resultado de su localización celular relativamente inaccesible en comparación con la CK-MB, mioglobina y H-FABP. Las troponinas regulan la interacción física de la actina y la miosina y por lo tanto se encuentran casi totalmente asociadas dentro de la estructura cristalina del sarcómero de las células del músculo estriado. (6) El complejo troponina está compuesto por 3 formas: I, T y C. Las troponinas I y T existen como isoformas específicas cardíacas con epítopes que difieren de las isoformas esqueléticas correspondientes. Además, los niveles circulantes normales, ausentes o extremadamente bajos, de la troponina proporcionan el mayor intervalo dinámico de cualquiera de los biomarcadores disponibles en la actualidad. (7) Aunque no hay duda de que las troponinas han revolucionado la detección y el tratamiento de los pacientes con IAM (8), tienen desventajas. La liberación lenta de la troponina retrasa el diagnóstico y la iniciación de los tratamientos específicos que podrían salvar el tejido del corazón en aquellos en los que se eleva. Del mismo modo, los pacientes en los que está ausente, y que en última instancia se reasegura y descarga, son admitidos en el hospital innecesariamente. Además, la persistencia de las troponinas limita su utilidad en el diagnóstico de recidiva de infarto. Por lo tanto, es ampliamente aceptado que existe una necesidad de nuevos biomarcadores que puedan diagnosticar el IAM más temprano durante su historia natural y / o que tengan una vida media plasmática corta que permita el uso en el diagnóstico y la cuantificación de recidiva de infarto. El propósito de este estudio fue usar la plataforma de los corazones de ratón perfundidos con cristaloides para realizar un análisis proteómico sistemático del efluente coronario después de un AIM mínimo con el fin de identificar nuevos biomarcadores potenciales.

50 El documento WO 2008/104289 desvela el uso de MYBPC3 en forma de biomarcador de la actividad PPARa en mamíferos. Sin embargo, este documento no desvela el uso de MYBPC3 para el diagnóstico de la lesión cardíaca.

Sumario de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la lesión cardíaca, en especial el infarto agudo de miocardio (IAM) que comprende identificar una elevada concentración de proteína C de unión a miosina cardíaca (cMyBP-C) o un fragmento de la misma en una muestra obtenida de un sujeto.

El procedimiento de la invención se puede usar para diagnosticar el IAM u otras lesiones cardíacas tales como insuficiencia cardíaca, miocarditis, embolia pulmonar y sepsis. Preferentemente, el procedimiento se usa para diagnosticar el IAM.

5 El término IAM es bien conocido en el corazón y se produce cuando se interrumpe el suministro de sangre a una parte del corazón.

La cMyBP-C es una proteína bien conocida. La secuencia de la proteína se puede encontrar en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) con el número de acceso Q14896 ó MYPC3_HUMAN.

10 La muestra contiene preferentemente cMyBP-C o un fragmento de la misma. El fragmento es preferiblemente de la parte N terminal de la proteína. El fragmento preferiblemente tiene una masa inferior a 50 kDa, más preferiblemente inferior a 45 kDa, más preferiblemente alrededor de 40 kDa. El fragmento comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos que tiene una homología sustancial a la secuencia de aminoácidos 1 a 362 de cMyBP-C. Homología sustancial se refiere preferiblemente a una homología de al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%. Más preferiblemente, el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos 1 a 362 de cMyBP-C.

15 La muestra es preferiblemente una muestra de sangre obtenida del paciente. La muestra puede ser sangre venosa o arterial, pero es preferiblemente sangre venosa periférica. La muestra es preferiblemente una muestra que ha sido obtenida dentro de las 36 horas desde la aparición de los síntomas de la lesión cardíaca, especialmente el dolor, más preferiblemente dentro de las 24 horas, incluso más preferiblemente dentro de las 12 horas, más preferiblemente dentro de las 6 horas de la aparición de los síntomas.

20 El término concentración elevada significa preferiblemente que el marcador en cuestión está presente a una concentración mayor en la muestra de lo que se espera que se encuentre en una muestra de un sujeto que no ha padecido un infarto de miocardio o de una muestra previamente obtenida de ese individuo. Los niveles esperados se pueden predecir por muestreo de la sangre de un número de individuos y la identificación de un intervalo convencional de concentraciones de cMyBP-C o un fragmento de la misma.

25 Cuando el marcador es cMyBP-C, la concentración de cMyBP-C puede ser elevada, o la concentración de un fragmento de cMyBP-C puede ser elevada. Las concentraciones pueden ser elevadas en comparación con concentraciones convencionales previstas, o la concentración de fragmento en relación con la proteína entera puede ser elevada. Por ejemplo, se pueden comparar las concentraciones de la proteína entera y el fragmento y se puede usar un cambio en la relación esperada para indicar el IAM.

30 Cuando el marcador es cMyBP-C, la concentración de cMyBP-C requerida para diagnosticar que un paciente ha sufrido un infarto es preferiblemente al menos la concentración convencional de cMyBP-C, más preferiblemente al menos cinco veces la concentración convencional, incluso más preferiblemente al menos diez veces la concentración convencional, más preferiblemente al menos quince, especialmente alrededor de diecinueve veces la concentración convencional.

Los marcadores se pueden identificar usando cualquier procedimiento apropiado, tal como un ensayo de unión, por ejemplo ELISA. También se prevén otros procedimientos, tal como el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento y detección por espectrometría de masas.

35 También se proporciona un kit para el diagnóstico de IAM, que comprende: una molécula de unión marcada que se une específicamente a cMyBP-C; y una molécula de unión marcada que se une específicamente a un fragmento de cMyBP-C.

Una molécula de unión marcada es cualquier molécula que se une al marcador en cuestión y que tiene una marca para permitir que se confirme la unión. Los ejemplos incluyen anticuerpos marcados, tales como anticuerpos marcados en el ensayo ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

40 La invención se describirá ahora en detalle a modo de ejemplo solamente con referencia a los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización del infarto de miocardio y contenido proteico del efluente coronario.

45 A; Relación entre el grado del infarto y la duración de la isquemia. Se sometieron corazones aislados de ratones retrógradamente perfundidos a 0, 5, 20 o 30 minutos de la isquemia global (sin flujo) seguido de 2h de reperfusión. El tamaño del infarto se demarcó por tinción con TTC.

B; Análisis de efluentes coronarios por inmunotransferencia. Se recogieron efluentes coronarios después de la duración indicada de la isquemia global y se sondearon para detectar la presencia de CK-MB, troponina I y troponina T.

5 C; Las muestras se sondearon para detectar la presencia de IgG después de 30 minutos o 5 minutos de perfusión (eliminación).

D; Estimación del contenido proteico del efluente coronario por tinción con plata. Los efluentes coronarios recogidos en el inicio de la reperfusión después del período indicado de la isquemia se concentraron y se analizaron por gel 1D (5% - 20%) y se tñieron con plata. Se extrajeron todas las bandas y, después en digestión trípica en gel, los péptidos se identificaron por MS-MS (proteínas que figuran en la tabla complementaria 1).

10 Figura 2. Un gel DIGE-2D representativo de proteínas que aparecen en los efluentes coronarios después de 5 minutos de isquemia global (Cy5, rojo) y perfusión de control emparejada (Cy3, verde). Se concentraron los efluentes coronarios de corazones de control e isquémicos y la misma cantidad de proteína se marcó con tinte de cianina antes de la separación por electroforesis en gel 2D. Las manchas anotadas se extrajeron y se identificaron mediante LC-MS / MS. (Véase tabla complementaria 2 para la lista completa de proteínas).

15 Figura 3. Un gel DIGE-2D representativo teñido con plata de proteínas que aparecen en los efluentes coronarios después de 5 minutos de isquemia global y perfusión de control emparejada. Se indican los biomarcadores conocidos identificados por espectrometría de masas después de la recolecta.

Figura 4. Verificación por inmunotransferencia de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo que aparecen en el efluente coronario después de la isquemia.

20 A; Análisis de efluentes coronarios recogidos después de 5 minutos de isquemia o perfusión de control de emparejamiento por electroforesis 1D. Se detectaron peroxirredoxinas y sus formas oxidadas postraduccionalmente modificadas (Prx-SO₃) solamente después de la isquemia. Se usaron bandas de inmunotransferencia para CK y troponina en forma de controles para indicar la liberación de proteínas selectivas de la isquemia.

25 B; Análisis de efluentes coronarios recogidos después de 5 minutos de isquemia o perfusión de control de emparejamiento por electroforesis 2D. Bandas de inmunotransferencia de un gel 2D (tira de 18cm, pH 4 - 7, gel en gradiente del 12% al 20%) para formas oxidadas y totales de peroxirredoxina 6. La peroxirredoxina 6 sólo está presente en el efluente coronario isquémico y se pueden visualizar varias modificaciones post-traduccionales, entre ellas la Prx -SO₃ en estado oxidado.

30 Figura 5. Proteínas liberadas en el efluente coronario. La liberación de proteínas después de la isquemia se representa gráficamente como el cambio en la abscisa frente a la abundancia absoluta en la ordenada. La abundancia se calcula por el recuento espectral normalizado obtenido para el PM de la proteína individual. Los biomarcadores conocidos del infarto de miocardio se destacan en rojo y las proteínas en el efluente coronario que ocupan un espacio similar en la gráfica están numeradas y figuran en la tabla 4.

35 Figura 6. Verificación y validación de cMyBP-C como un nuevo biomarcador potencial del infarto agudo de miocardio.

A; Separación 1 D e inmunotransferencia de proteínas en el efluente coronario. Se recogieron los efluentes coronarios después de 5 minutos de isquemia o perfusión de control de emparejamiento.

40 B; Contenido de cMyBP-C entre los órganos de ratón. El anticuerpo anti-cMyBP-C reaccionó solamente con tejido cardíaco. Se usó antiactina en forma de control de carga.

45 C; Detección de cMyBP-C en el plasma de ratones sometidos a infarto agudo de miocardio. Los ratones fueron sometidos a ligadura temporal de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (30 min) seguida de reperfusión (2 horas). Se recogió la sangre y el plasma se inmunotransfirió para cMyBP-C. La cMyBP-c de longitud completa en 140kDa, y el producto de degradación a 40 kDa, se detectaron ambos de forma selectiva en el plasma de ratones sometidos a ligadura de la arteria coronaria temporal, pero no simulada.

D y E; Cuantificación de formas cortas y de longitud completa de cMyBP-C. Los datos se derivan de ratones N = 6 por grupo.

50 Figura 7. Efluentes coronarios recogidos después del periodo indicado de isquemia y analizados por HPLC usando una columna Zorbax C8 y detección a 205 nm y 280 nm. *Procedimientos*: Los efluentes coronarios concentrados se analizaron directamente en HPLC de fase inversa con una columna Zorbax C8. Las proteínas se eluyeron usando un gradiente de B al 0% hasta B al 100% en 40 minutos a 1 ml / min, en el que AB es un sistema

disolvente. El tampón A está compuesto por agua adicionada con TFA al 0,1%, el tampón B está compuesto por agua al 10%, acetonitrilo al 90% y TFA al 0,1%. Las proteínas y los péptidos se detectaron a 205 nm y 280 nm.

5 Figura 8. Intercambio de tintes de 2D DIGE. Los efluentes coronarios de corazones de ratones de control están marcados con Cy3 y los corazones isquémicos con Cy5 (A). En el panel B, los tintes se intercambian entre las muestras de control e isquémicas para excluir artefactos específicos de tintes.

Figura 9. Visión comparativa de geles 2D de fluorescencia DIGE. Los efluentes coronarios de corazones de ratones de control se marcaron con Cy3 (A, color verde) y de corazones de ratones isquémicos con Cy5 (B, color rojo). Las manchas correspondientes a los biomarcadores conocidos de infarto agudo de miocardio y de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo se destacan en el gel 2D (B).

10 Figura 10. Cuantificación de cMyBP-C

En cada pocillo se han cargado cantidades crecientes de C0-C1 recombinante (6 a 384 ng). El anticuerpo primario (A) se detectó con un secundario policlonal anti-conejo. Aunque no está claro en esta reproducción, se discierne una banda a 6 ng en el original y con una exposición más prolongada.

Figura 11. Comparación de la cMyBP-C recombinante con proteína endógena

15 Los carriles de la izquierda comprenden cantidades crecientes de proteína C0-C1 recombinante (ng) y los carriles de la derecha homogeneizados brutos de reserva de corazón de ratón (en μ l). El anticuerpo primario (A) detecta la cMyBP-C en su forma truncada y de longitud completa. El fragmento de C0-C1 recombinante se procesa a aproximadamente 37 kDa, mientras que el fragmento de escisión dominante de la cMyBP-C nativa, presente en el
20 homogeneizado bruto de corazón, comprende 2 bandas de aproximadamente 40 kDa. La cMyBP-C de longitud completa se procesa a aproximadamente 140kDa. Con 16 μ l de homogeneizado bruto se hace visibles una serie de otros productos de degradación. Todas las muestras se procesan sobre un solo gel, aunque se han extraído los carriles intermedios.

Figura 12. Detección de cMyBP-C derivada del miocardio en suero humano

25 Los carriles de la derecha son suero humano (suero) solo diluido 1 : 1 con tampón de muestra y 4 μ l de homogeneizado de reserva de corazón entero (WH), como se usa en la figura 2. Los carriles de la izquierda son el homogeneizado de reserva (4 μ l) completado hasta un volumen de 30 μ l con suero humano diluido en relaciones crecientes de tampón de muestra de derecha (1 : 1) a izquierda (1 : 16). La densidad de la banda que representa la MyBP-C de longitud completa (140 kDa) aumenta con suero moderadamente diluido (1 : 2 a 1 : 8), pero no está presente con suero solo. El segundo anticuerpo se une de forma no específica a un número de proteínas de suero,
30 probablemente inmunoglobulinas, procesándose la más dominante sólo por encima de 40 kDa, interfiriendo con la detección del fragmento de la cMyBP-C a 40 kDa visto en el carril del WH. Sin embargo, la cMyBP-C de longitud completa se procesa por encima de estas bandas de suero no específicas.

Figura 13. Detección de la liberación de la cMyBP-C de longitud completa en el suero de ratones sometidos a ligadura de la arteria coronaria con y sin reperfusión.

35 WH es homogeneizado de corazón de ratón entero. Otras muestras son suero de ratón diluido 1: 1 con tampón de muestra. C es de un ratón sin ligadura de la arteria coronaria. Las muestras de reperfusión son suero obtenido de la extracción terminal de los ratones individuales recogido en diversas ocasiones después de la liberación de una oclusión de la arteria coronaria de 30 minutos. Las muestras de isquemia son de extracciones terminales sin liberación de la oclusión de la arteria coronaria que se mantuvo durante 90 o 120 minutos. Se pueden observar
40 bandas no específicas en C, sin embargo, la cMyBP-C de longitud completa se procesa por separado a 140kDa. Además, también es visible un fragmento de degradación justo por debajo de la banda de inmunoglobulina, a aproximadamente 40 kDa. El fragmento de longitud completa aparece en la circulación muy rápidamente.

Figura 14. Detección de la liberación de la cMyBP-C de longitud completa en pacientes con IAM

45 Se diluyó suero humano de un voluntario (C) y pacientes con IAM pequeños (MI1 - MI3) y grandes (MI4 - MI6) 1: 1 en tampón de muestra. WHH es homogeneizado de corazón humano entero. El carril de más a la izquierda es el mismo que el carril adyacente de WHH, pero explorado desde una exposición de duración más corta de la membrana. El anticuerpo primario (A) detecta la cMyBP-C humana. Desafortunadamente el carril de C1 se ha distorsionado y puede haber un rastro de derrame del carril adyacente.

Descripción detallada de la invención

50 Ejemplo 1

Material y procedimientos:*Animales*

5 Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la *United Kingdom Home Office Guidance on the Operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, publicado por Her Majesty's Stationary Office, Londres y con la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicados por US National Institutes of Health (Publicación NIH nº 85 - 23, revisada en 1996).

Perfusión de corazones murinos aislados

10 Se anestesiaron ratones machos C57BL / 6 con pentobarbital (300 mg / kg) y heparina (150 unidades) por vía intraperitoneal. Los corazones se aislaron rápidamente, se montaron en un aparato Langendorff y se perfusionaron retrógradamente a una presión constante de 80 mm Hg con tampón Krebs-Henseleit (en mmol / l: NaCl 118,5, NaHCO₃ 25,0, KCl 4,75, KH₂PO₄ 0,18, MgSO₄ 1,19, D-glucosa 11,0, y CaCl₂ 1,41) equilibrados con O₂ al 95% y CO₂ al 5% a 37°C. La estimulación auricular se realizó a 580 bpm.

Protocolo experimental para estudios de infarto de miocardio murino aislado

15 Previamente se ha publicado un procedimiento detallado. (9) En resumen, los corazones se estabilizaron durante 30 minutos después de la iniciación la perfusión retrógrada. Todos los corazones se sometieron a un periodo de isquemia global (como se indica en la figura 1A), seguido de 2 horas de reperfusión. Al final de la reperfusión, los corazones se perfusionaron con cloruro de trifetil tetrazolio (TTC). Las zonas de riesgo e infarto se calcularon a partir del análisis del área de superficie de secciones del eje corto del miocardio ventricular izquierdo. El análisis del infarto de miocardio, negativo para TTC, se realizó en todos los casos por un investigador ajeno a las asignaciones de grupo.

Protocolo experimental para estudios de efluentes coronarios

25 Los corazones se perfusionaron en un aparato Langendorff como se ha descrito previamente (9) con las siguientes modificaciones: Para limitar el daño no isquémico al corazón, y de ese modo liberar la proteína no específica, se omitió un globo intraventricular. Los corazones se estabilizaron durante 30 minutos después de la iniciación de la perfusión retrógrada para permitir una completa eliminación de la sangre y limitar la contaminación del efluente coronario por proteínas plasmáticas. Los corazones sometieron a 5 minutos de isquemia global (sin flujo) a menos que se especifique otra cosa, y el efluente coronario se recogió al comienzo de la reperfusión en una alícuota de 5 ml con Triton X100 a una concentración final del 0,05% para reducir la absorción de la proteína. (10) Las alícuotas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

30 Los efluentes coronarios se descongelaron y se mantuvieron a 4°C en todo momento. El efluente coronario se concentró usando una columna Vivaspin, con un límite de 3000 Da, de Sartorius.

Protocolo experimental para la ligadura de LAD in vivo

35 La oclusión de la arteria coronaria se consiguió usando el sistema de peso que cuelga como se describe anteriormente (11, 12). Los ratones se sometieron a 30 minutos de isquemia y 2 horas de reperfusión y la sangre se recogió por punción cardíaca al final de la reperfusión. La sangre se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4°C y las alícuotas de plasma se almacenaron a -80°C.

Immunotransferencia

40 Los efluentes coronarios concentrados se separaron por SDS-PAGE y se inmunotransfirieron usando los protocolos anteriormente descritos (9). Los siguientes anticuerpos primarios se usaron contra: creatina quinasa M / B (# sc-28898 de Santa Cruz), Troponina T (# ab10214 de Abcam), Troponina I (# 4002 de Señalización Celular), Peroxirredoxina 6 (# LF-PA0011), Peroxirredoxina 6-SO₃ (# LF-PA0005), Peroxirredoxina-SO₃ (# LF-PA0004) todas de Labfrontier. (# = Número de catálogo). El anticuerpo dirigido contra la región C0-C1 de la proteína C de unión a la miosina cardíaca fue un obsequio del Prof Gautel M. (Instituto Randall, KCL, Londres). (13) Para la inmunotransferencia de geles 2D, se reunieron efluentes coronarios concentrados de corazones de ratones isquémicos o de control y se concentraron adicionalmente antes de usar el kit de limpieza 2D "ready prep" de Biorad siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cargaron 30 µg de extractos de proteínas en una tira IPG (18 cm, pH 4 - 7 no lineal de GE Healthcare) y a continuación, en un gel con gradiente grande SDS-PAGE (12% - 20%) usando un gel acumulador.

LC-MS / MS de 1D gel

50 Para la proteómica, se reconstituyeron los efluentes coronarios concentrados en tampón Laemmli y se separaron

por geles de SDS-PAGE. Los geles con gradiente de gran formato (5% - 20%) se moldearon usando el optimizador 2DE (NextGen Science, Huntingdon, Reino Unido). Después de que los geles se recubrieran con butanol saturado con agua (2 : 1) y se dejaron polimerizar durante toda la noche, el gel acumulador que contiene acrilamida al 4% - 5% débilmente tamponada a pH 9,0 se moldeó sobre el gel de resolución ya establecido. Una vez cargadas las muestras, se aplicó una corriente constante de 50 mA mientras las proteínas migraban por el gel acumulador, en el límite de gel acumulador / gel de procesamiento se incrementó la corriente y se mantuvo a 75 mA hasta que la parte frontal del tinte alcanzó el final del gel. Después de la tinción con plata (kit de tinción con plata Plus one, GE Healthcare), se extrajeron todas las bandas de gel y se sometieron a análisis de LC-MS / MS.

Electroforesis en gel bidimensional.

Los extractos de proteínas preparados usando el kit de limpieza 2D "ready prep" se volvieron a suspender en tampón de lisis (urea 8M, CHAPS al 4% p / v, Tris-Cl 30 mM, pH 8,5) compatible con el marcaje DIGE (GE Healthcare). Después de centrifugación a 13.000 g durante 10 min, se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas solubles y se determinó la concentración de las proteínas usando una modificación del procedimiento descrito por Bradford. La reacción del marcaje del tinte de fluorescencia se llevó a cabo a una relación de tinte / proteína de 400 pmol / 100 µg. Después de la incubación en hielo durante 30 min, la reacción de marcaje se detuvo depurando el tinte no unido con lisina 10 mM (L8662, Sigma) durante 15 minutos. Para la electroforesis en gel bidimensional, se mezclaron muestras con 2x tampón (urea 8M, CHAPS al 4% p / v, DTT al 2% p / v, Pharmalytes al 2% v / v 3 - 10 para IEF), se diluyeron 20 µg por muestra en solución de rehidratación (urea 8M, CHAPS al 0,5% p / v, DTT al 0,2% p / v, y Pharmalyte al 0,2% v / v, pH 3 - 10) y se cargaron en tiras IPG (18 cm, pH 3 - 10, no lineal, GE Healthcare). Después de rehidratación durante toda la noche, las tiras se centraron en tiras de 0,05 mA / IPG para 60 kWh a 20°C (Multiphor II, GE Healthcare). Cuando se completó la IEF, las tiras se equilibraron en urea 6M que contiene glicerol al 30% v / v, SDS al 2% p / v y azul de bromofenol al 0,01% p / v, con la adición de DTT al 1% p / v durante 15 min, seguido por el mismo tampón sin TDT, pero con la adición de yodoacetamida al 4,8% p / v durante 15 min. El SDS-PAGE se realizó usando geles de poli(acrilamida) T al 12% (concentración total de acrilamida), C al 2,6% (grado de reticulación) sin un gel acumulador, usando el sistema Ettan DALT (GE Healthcare). La segunda dimensión se terminó cuando el tinte de azul de bromofenol había migrado del extremo inferior de los geles. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron mediante el generador de imágenes de modo variable Typhoon 9400 (GE Healthcare). Finalmente, los geles se fijaron durante toda la noche en solución de metanol : ácido acético : agua (4 : 1 : 5 v / v / v). Los perfiles de las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata usando el kit de tinción con plata Plus one (GE Healthcare) con ligeras modificaciones para asegurar la compatibilidad con el análisis de espectrometría de masas posterior. Para la documentación, los geles teñidos con plata se exploraron en el modo de exploración por transmisión usando un escáner calibrado (GS-800, Bio-Rad). Las matrices de correspondencia se crearon mediante el uso de Proteomeweaver 2.0 (Definiens). Los geles DIGE se analizaron usando el software DeCyder (Version 6.5, GE Healthcare). Una metodología detallada está disponible en nuestro sitio web <http://www.vascular-roteomics.com>.

LC-MS / MS.

Para la espectrometría de masas en tándem (MS / MS), la digestión en gel con tripsina se realizó de acuerdo con los procedimientos publicados (14) modificados para usar con un sistema de digestión robótico Investigator ProGest (Genomic Solutions). Se inyectó 10 µl de muestra mediante un tomador de muestras automático (Thermo Electron Corporation, CA) y se cargó en una columna de cromatografía líquida (LC) de fase inversa de 100 x 0,18 mm (BioBasic-18, tamaño de partícula 5 µm, Thermo Electron Corporation) a 2 µl / min usando una bomba Surveyor MS (Thermo Electron Corporation, CA) y se eluyó con un gradiente de 90 min (B al 0,1% - 30% en 35 min, B al 30% - 50% en 10 min y B al 50 - 80% en 5 min, en el que A = H₂O al 99,9%, ácido fórmico al 0,1% y B = acetonitrilo al 99,9%, ácido fórmico al 0,1%). La columna se acopló a una fuente de electronebulización y los espectros se recogieron de un analizador de masas atrapa iones (LCQ Deca XP Plus, Thermo Electron Corporation) usando el modo de exploración de iones completo sobre el intervalo de masa a carga (m / z) de 300 - 1800. La MS / MS se realizó en los tres primeros iones de cada explorador de MS usando el modo de adquisición dependiente de datos con exclusión dinámica habilitada. Los espectros MS / MS se correspondieron con las entradas de la base de datos (UniProt Knowledgebase Release 7.5, constituido por: UniProtKB/Swiss-Prot Release 49.5 y UniProtKB/TrEMBL Release 32.5 de 18 de Abril de 2006) usando el software TurboSEQUENT (Bioworks 3.3, Thermo Finnigan). Se precisó que todas las asignaciones de las secuencias de péptidos resultaran de las escisiones plenamente trípticas de las proteínas correspondientes. Se usó Scaffold (versión 1.0, Proteome Software Inc., Portland, O) para validar las identificaciones de proteínas y péptidos basadas en MS / MS. Las identificaciones de los péptidos se aceptaban si se podían establecer a más del 95,0% de probabilidad, tal como se especifica por el algoritmo de Peptide Prophet. La identificación de las proteínas se aceptaba si se podían establecer a más del 99,0% de probabilidad y contenían al menos 2 péptidos identificados. Las probabilidades de las proteínas se asignaron con el algoritmo Protein Prophet.

Resultados

El modelo de corazones murinos perfundidos Langendorff.

Para imitar la isquemia miocárdica, se usan corazones del ratón perfundidos Langendorff. En este modelo, el corazón se perfunde de forma retrógrada con un tampón libre de proteínas convencional (Tampón Krebs Henseleit) a una presión constante. Antes de la isquemia indexada, todos los corazones se perfundieron durante 30 minutos para permitir la recuperación de la función normal (15) y para evitar un traspaso de las proteínas plasmáticas. En comparación con períodos de eliminación / estabilización más cortos, había significativamente menos IgG en el efluente coronario (Figura 1C). El efecto dependiente del tiempo de la isquemia en el tamaño del infarto se muestra en la Figura 1A: el tamaño del infarto aumentó del 4,5% al 50% con 5 min a 30 minutos de isquemia global. El efluente coronario se recogió después de 1, 5 y 30 minutos de isquemia y se examinó para detectar la liberación de los biomarcadores conocidos del daño tisular por inmunotransferencia. La Figura 1B muestra la liberación de creatina quinasa (una proteína citoplasmática) y de troponina I y troponina T (proteínas de miofilamentos) después de 1, 5 o 30 minutos de duración de la isquemia. Es importante señalar que estos marcadores de la lesión miocárdica no están presentes en los corazones de control (0 minutos), confirmando que la escisión y la perfusión cardiaca, en ausencia de isquemia, no produce un daño discernible. No se ha podido detectar la liberación de marcadores de lesión miocárdica con la menor duración de isquemia (1 minuto), sugiriendo que la lesión detectable tiene lugar entre 1 y 5 minutos en este modelo. El perfil de liberación de proteínas en el corazón aislado y perfundido se acelera enormemente en comparación con la que se produce in vivo y se ha descrito una liberación similar rápida de la CK anteriormente. (16, 17) Este es probablemente el resultado de la hiperperfusión relativa producida por la baja viscosidad del líquido del perfusionado. La liberación de proteínas en el efluente coronario se monitorizó mediante HPLC de fase inversa (Figura 1 complementaria). De acuerdo con un informe anterior de Van Eyk (17), se observó una elución máxima predominante alrededor de 23 min usando una columna C8 Zobrax. Como era de esperar, la liberación de las proteínas aumentó con la duración de la isquemia.

Análisis del efluente coronario por LC-MS / MS de gel 1D

Para reducir la complejidad de la muestra, los efluentes coronarios se separaron en primer lugar de los geles de gradiente de gran formato (5% - 20%) y se tiñeron con plata (Figura 1D). En particular, la duración más corta de la isquemia en la que existía una diferencia detectable en el efluente coronario en comparación con la liberación de proteínas de la línea de base era en 5 min. Aunque este momento producía sólo infarto menor (véase Figura 1 A) se usó para análisis proteómico adicional. Se extrajeron todas las bandas del gel, se sometieron a digestión triptica y se identificaron por espectrometría de masas en tándem de cromatografía nanoflujo de fase inversa. En total se identificaron 487 proteínas en el efluente coronario isquémico en comparación con sólo 209 en las muestras de control (véase tabla complementaria 1 para la lista completa de proteínas). Por lo tanto, 278 proteínas eran únicas a las muestras de reperfusión de isquemia. Además, todos los biomarcadores conocidos de lesión miocárdica, tales como las troponinas I, C, T, la creatina kinasa, lactato deshidrogenasa, mioglobina, proteína de unión de ácidos grasos específicos del corazón, aspartato aminotransferasa etc. estaban entre las proteínas identificadas (tabla 1). La cuantificación relativa de la liberación de proteínas después de la isquemia se obtuvo mediante el uso del recuento espectral normalizado. Mientras que la troponina I, troponina T, troponina C sólo se detectaron en el efluente coronario después de la isquemia, pero no en la línea de base, otros marcadores tales como CK, FABP, LDH, etc estaban presentes en ambas condiciones (tabla 1). Sin embargo, el número de péptidos identificados para CK se incrementó en 8 veces, FABP en 11 veces, y lactato deshidrogenasa en 6 veces en corazones isquémicos en comparación con los normóxicos y su apariencia / enriquecimiento destaca su potencial como biomarcadores clínicos para lesión miocárdica.

Análisis de efluentes coronarios por electroforesis diferencial en gel (DIGE)

Las modificaciones postraduccionales de albúmina producidas por estrés oxidativo durante la reperfusión de isquemia, conocidas como albúmina modificada por isquemia (abreviadamente en inglés, IMA), ya se usan clínicamente en forma de biomarcador de isquemia. Para determinar si las modificaciones post-traduccionales útiles de manera similar tuvieron lugar en proteínas en el efluente coronario, se analizaron las muestras de control e isquémicas por electroforesis diferencial en gel (DIGE) 2D (Figura 2). Los resultados se reproducen usando un intercambio de tinte (Figura 2 complementaria). La intensidad de fluorescencia se cuantificó en más de 200 manchas. Después de la tinción con plata, se extrajeron todas las manchas y se identificaron mediante espectrometría de masas en tándem. La lista de las proteínas identificadas se presenta en la tabla 2 complementaria. Los valores cuantitativos se obtuvieron mediante el uso del software DeCyder (GE Healthcare). El enfoque DIGE confirmó que la cuantificación basada en el recuento espectral, en que los marcadores conocidos de infarto de miocardio, tales como, troponina T, troponina C, isoformas CK MB, FABP, LDH y mioglobina estaban presentes en mayor abundancia en muestras isquémicas que en las de control (tabla 2 y Figura 3).

Verificación por inmunotransferencia de la identificación proteómica de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo.

Se generan oxígeno y otros radicales libres en el corazón isquémico y reperfusiónado y son mediadores importantes de la lesión post-isquémica (para revisión véase (18)). Nuestro análisis proteómico reveló la liberación de numerosas proteínas implicadas en la neutralización de radicales libres después de la isquemia / reperfusión, incluyendo la tioredoxina reductasa, peroxirredoxinas, etc. (véase tabla 3). Además, la separación por electroforesis en gel 2D también reveló que la lesión isquémica inducía un cambio ácido en el punto isoelectrico de proteínas que contienen cisteínas activas por redox, como se ilustra para Peroxiredoxin 6 (Figura complementaria 3B). Este hallazgo concuerda con informes anteriores que confirman la sulfoxidación como una modificación postraducciona comú n en las proteínas sensibles a redox (19). Para confirmar la presencia de estas proteínas potencialmente cardioprotectoras en efluentes coronarios isquémicos, se validaron los hallazgos por inmunotransferencia. La liberación de peroxirredoxina 1 - 3 y 6 no sólo era significativamente mayor en las muestras isquémicas en comparación con las de control (Figura 4A), sino que los anticuerpos contra peroxiredoxin 6 oxidada también confirmaron la presencia de la isoforma oxidada después de la isquemia miocárdica mediante inmunotransferencia en gel 1 D (figura 4A) y en gel de 2D (figura 4B). Por lo tanto, el análisis proteómico reveló pruebas de modificaciones postraduccionales de proteínas de defensa antioxidantes en los efluentes coronarios isquémicos.

Proteína C de unión a miosina como nuevo biomarcador candidato de la lesión miocárdica.

En la Figura 5, las proteínas en el efluente coronario post-isquémico se representan gráficamente en función de su abundancia calculada en base al recuento espectral normalizado. El cambio en veces, en comparación con los corazones de control, se traza en el eje y. Los biomarcadores más conocidos se agrupan en la parte superior izquierda que representa proteínas muy abundantes con una propensión marcada a filtrarse en el efluente coronario después de la isquemia. Curiosamente, la proteína C de unión a la miosina cardíaca (cMyBP-C) apareció en una región similar (figura 5) y su cambio en veces (19 veces) superó al de muchos biomarcadores establecidos. Posteriormente se verificó la liberación de cMyBP-C en el efluente coronario por inmunotransferencia (Figura 6A) usando un anticuerpo dirigido contra la región C0 - C1 de cMyBP-C, que sólo está presente en la isoforma cardíaca (Figura 6B) (para una revisión véase (20)). Además, se confirmó adicionalmente la liberación de cMyBP-C selectiva de isquemia en plasma después de isquemia miocárdica regional y reperfusión *in vivo*. Curiosamente, no solamente se pudo detectar una banda a 140kDa, correspondiente a la cMyBP-C de longitud completa, sino también un producto de degradación a 40 kDa (Figura 6C, D, E), que se ha señalado previamente en el miocardio post-isquémico (21, 22). Por lo tanto, el enfoque proteómico ha validado un número de biomarcadores existentes y ha revelado un nuevo marcador potencial específico cardíaco detectable sólo con la lesión miocárdica leve.

Discusión

El objetivo de este estudio era identificar nuevos biomarcadores potenciales analizando de forma exhaustiva las proteínas liberadas en el efluente coronario después de una duración de isquemia miocárdica elegida para producir lesión leve. El análisis proteómico extenso confirmó la presencia de todos los biomarcadores existentes de infarto agudo de miocardio (IAM), y también reveló modificaciones postraduccionales de proteínas antioxidantes e identificó la isoforma cardíaca de la proteína C de unión a la miosina (cMyBP-C) como un nuevo marcador potencial. Además, usando un modelo murino *in vivo* de IAM se podía detectar la cMyBP-C en el plasma.

Los corazones de ratón Langendorff perfusionados formaban la base de la plataforma de descubrimiento. Este modelo recapitula la verdadera lesión isquémica y permite una valoración cuidadosa de la duración de la isquemia para producir IAM mínimo, pero definido. Además, el modelo tiene la ventaja de limitar la contaminación del efluente coronario por proteínas plasmáticas. La elección de este modelo se justificó por su capacidad para identificar todos los biomarcadores existentes comúnmente usados de IAM (troponina I, troponina T, creatina quinasa, FABP, LDH, mioglobina). Un extenso análisis proteómico del efluente coronario identificó cerca de 500 proteínas que usan un enfoque de LC-MS / MS de gel 1D y alrededor de 200 proteínas que usan la plataforma DIGE. El análisis proteómico reveló que las troponinas, la norma de oro actual para evaluar el IAM, se encuentran entre las proteínas más abundantes en efluentes coronarios isquémicos y muestran una fuga mínima del miocardio normóxico (Tabla 1).

En los últimos años, la proteómica se ha usado ampliamente para el descubrimiento de biomarcadores potenciales para el cáncer (23), aterosclerosis (24), y enfermedad cardiovascular (para revisión véase (25)). Se usaron plasma y suero de forma rutinaria para descubrir el biomarcador, aunque el intervalo dinámico de las proteínas plasmáticas se extiende 9 órdenes de magnitud y sólo 5 proteínas constituyen típicamente más del 90% de la masa total de proteínas. Esta complejidad supera las capacidades analíticas de la mayor parte de las aproximaciones proteómicas. A pesar de estas dificultades evidentes, se han realizado varios estudios proteómicos para descubrir biomarcadores cardiovasculares predictivos, pero la mayoría de los estudios no lograron detectar los biomarcadores existentes y revelaron sólo cambios en las proteínas plasmáticas muy abundantes (26). En un enfoque alternativo, se analizó el efluente coronario en un modelo *ex vivo* en el que el corazón se perfusionó con un tampón cristaloides sin proteínas. Este enfoque se ha usado anteriormente por Koomen et al (27) en un modelo

de lesión por isquemia / reperfusión en corazones de ratas, pero se encontraron con una alta contaminación con las proteínas plasmáticas (el 30% de las 342 proteínas identificadas eran de origen plasmático), lo que minimiza la probabilidad de detectar biomarcadores cardíacos específicos potenciales. Al ampliar el período de eliminación y tal vez mediante el uso de corazones más pequeños, se logró reducir sustancialmente la contaminación por proteínas plasmáticas. Por otra parte, se empleó la última tecnología en atrapa iones (LTQ Orbitrap) y se usó un enfoque de LC / MS / MS gel de 1D, además de la electroforesis en gel 2D. Esto permitió detectar sustancialmente más proteínas, incluyendo todos los biomarcadores convencionales de lesión miocárdica, que contrasta con las publicaciones anteriores (27).

Durante este estudio surgió una cuestión metodológica en cuanto a si el análisis proteómico se debe hacer en el mismo volumen de efluente coronario o en la misma cantidad de proteína liberada. Está bien establecido que durante la reperfusión de isquemia hay un aumento de la liberación de proteínas por el tejido miocárdico. Para reflejar este fenómeno fisiopatológico, se comparó el mismo volumen de efluentes coronarios de corazones isquémicos y de control en el experimento de LC / MS-MS de gel 1D. Sin embargo, para identificar las modificaciones post-traduccionales específicas de isquemia, se comparó la misma cantidad de proteínas en el experimento DIGE. Aunque se detectaron menos proteínas en el enfoque basado en gel 2D en comparación con el enfoque LC / MS / MS de gel 1D, cabe destacar que se identificaron los biomarcadores conocidos de lesión cardíaca en ambos enfoques experimentales.

La identificación de la isoforma cardíaca de la proteína C de unión a la miosina en los efluentes coronarios isquémicos cumple algunos de los criterios de buen candidato a biomarcador: a saber, una proteína específica cardíaca con un pronunciado cambio en la respuesta a la lesión isquémica. En particular, sólo se encontró la presencia de cMyBP-C y un producto de degradación de 40 kD en el plasma de ratones con IAM. El fragmento más tarde corresponde a la parte N-terminal de cMyBP-C y fue descrito anteriormente en corazones de ratón sometido a reperfusión de isquemia (21) y en corazones de perros sometidos a isquemia de bajo flujo (22). Sin embargo, su liberación en la circulación después de la lesión miocárdica no se ha reseñado previamente y puede proporcionar información específica a las circunstancias fisiológicas. Las troponinas han revolucionado el tratamiento del IAM. Sin embargo, la cMyBP-C se puede liberar de forma más rápida y tiene una vida media de circulación más corta. Si este es el caso, tendría la ventaja de permitir incluir o descartar más rápido el IAM en pacientes con dolor de pecho. Una ventaja adicional es que podría permitir el diagnóstico y la cuantificación de recidiva de infarto en pacientes en los que se confirma el IAM. Esto sería especialmente ventajoso en ensayos de dispositivos de intervención de los que se cree que disminuyen el IAM periprocedimiento. (28)

En resumen, el presente estudio tuvo como objetivo identificar nuevos biomarcadores potenciales de IAM. Se realizó una identificación exhaustiva de las proteínas liberadas en el efluente coronario durante la isquemia miocárdica, que reveló la isoforma cardíaca proteína C de unión a la miosina en forma de un nuevo biomarcador potencial. Otros estudios en seres humanos serán necesarios para corroborar estas conclusiones y evaluar la ventaja clínica, si existe, de la cMyBP-C sobre biomarcadores existentes de IAM.

Ejemplo 2

Los inventores investigaron la cuantificación de la cMyBP-C más allá y también compararon la cMyBP-C recombinante con la proteína endógena. Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11. Los inventores después siguieron con la detección de la cMyBP-C derivada del miocardio en suero humano. Los resultados se muestran en la figura 12.

La cMyBP-C de longitud completa se detectó en el suero de ratones sometidos a la ligadura de la arteria coronaria. También se podría ver un fragmento de 40 kDa. Los resultados se muestran en la figura 13. Además, los inventores pudieron detectar la liberación de la cMyBP-C de longitud completa en pacientes con IAM.

Referencias

1. Rajappa, M., and Sharma, A. (2005) Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology* 56
2. Apple, F. S., Wu, A. H., Mair, J., Ravkilde, J., Panteghini, M., Tate, J., Pagani, F., Christenson, R. H., Mockel, M., Danne, O., and Jaffe, A. S. (2005) Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 51.
3. Saenger, A. K., and Jaffe, A. S. (2008) Requiem for a Heavyweight: The Demise of Creatine Kinase-MB. *Circulation* 118.
4. Pelsers, M. M., Hermens, W. T., and Glatz, J. F. (2005) Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 352.

5. Wunderlich, M. T., Hanhoff, T., Goertler, M., Spener, F., Glatz, J. F., Wallesch, C. W., and Pelsers, M. M. (2005) Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *J Neurol* 252.
- 5 6. Parmacek, M. S., and Solaro, R. J. (2004) Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog Cardiovasc Dis* 47.
7. French, J. K., and White, H. D. (2004) Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. *Heart* 90.
8. Antman, E. M., Tanasijevic, M. J., Thompson, B., Schactman, M., McCabe, C. H., Cannon, C. P., Fischer, G. A., Fung, A. Y., Thompson, C., Wybenga, D., and Braunwald, E. (1996) Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 335.
- 10 9. Jacquet, S., Nishino, Y., Kumphune, S., Sicard, P., Clark, J. E., Kobayashi, K. S., Flavell, R. A., Eickhoff, J., Cotten, M., and Marber, M. S. (2008) The role of RIP2 in p38 MAPK activation in the stressed heart. *J Biol Chem* 283.
- 15 10. Lowbeer, C., Kawakami, T., Tahepjld, P., Gustafsson, S. A., Vaage, J., and Valen, G. (2002) Importance of preanalytical handling of samples for measurement of cardiac troponin T in coronary effluent from isolated rat hearts. *Scand J Clin Lab Invest* 62.
11. Clark, J. E., Kottam, A., Motterlini, R., and Marber, M. S. (2008) Measuring left ventricular function in the normal, infarcted and CORM-3-preconditioned mouse heart using complex admittance-derived pressure volume loops. *J Pharmacol Toxicol Methods*.
- 20 12. Eckle, T., Grenz, A., Kohler, D., Redel, A., Falk, M., Rolaufts, B., Osswald, H., Kehl, F., and Eitzschig, H. K. (2006) Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291.
13. Gautel, M., Furst, D. O., Cocco, A., and Schiaffino, S. (1998) Isoform transitions of the myosin binding protein C family in developing human and mouse muscles: lack of isoform transcomplementation in cardiac muscle. *Circ Res* 82.
- 25 14. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silverstained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68.
15. Jacquet, S., Zarrinpashneh, E., Chavey, A., Ginion, A., Leclerc, I., Violette, B., Rutter, G. A., Bertrand, L., and Marber, M. S. (2007) The relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and AMP-activated protein kinase during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 76.
- 30 16. Marber, M. S., Mestral, R., Chi, S. H., Sayen, M. R., Yellon, D. M., and Dillmann, W. H. (1995) Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95.
17. Van Eyk, J. E., Powers, F., Law, W., Larue, C., Hodges, R. S., and Solaro, R. J. (1998) Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res* 82.
- 35 18. Zweier, J. L., and Talukder, M. A. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70.
19. Schroder, E., Brennan, J. P., and Eaton, P. (2008) Cardiac peroxiredoxins undergo complex modifications during cardiac oxidant stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295.
- 40 20. Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J., and Watkins, H. (2004) Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res* 94.
21. Sadayappan, S., Osinska, H., Klevitsky, R., Lorenz, J. N., Sargent, M., Molkentin, J. D., Seidman, C. E., Seidman, J. G., and Robbins, J. (2006) Cardiac myosin binding protein C phosphorylation is cardioprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.
- 45 22. Yuan, C., Guo, Y., Ravi, R., Przyklenk, K., Shilkofski, N., Diez, R., Cole, R. N., and Murphy, A. M. (2006) Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts--evidence for novel phosphorylation sites. *Proteomics* 6.

23. Diamandis, E. P. (2004) Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Mol Cell Proteomics* 3.
24. Martinez-Pinna, R., Martin-Ventura, J. L., Mas, S., Blanco-Colio, L. M., Tunon, J., and Egido, J. (2008) Proteomics in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 10.
- 5 25. Edwards, A. V., White, M. Y., and Cordwell, S. J. (2008) The role of proteomics in clinical cardiovascular biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 7.
26. Mateos-Caceres, P. J., Garcia-Mendez, A., Lopez Farre, A., Macaya, C., Nunez, A., Gomez, J., Alonso-Orgaz, S., Carrasco, C., Burgos, M. E., de Andres, R., Granizo, J. J., Farre, J., and Rico, L. A. (2004) Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 44.
- 10 27. Koomen, J. M., Wilson, C. R., Guthrie, P., Androlewicz, M. J., Kobayashi, R., and Taegtmeier, H. (2006) Proteome analysis of isolated perfused organ effluent as a novel model for protein biomarker discovery. *J Proteome Res* 5.
28. Srinivasan, M., Rihal, C., Holmes, D. R., and Prasad, A. (2009) Adjunctive thrombectomy and distal protection in primary percutaneous coronary intervention: impact on microvascular perfusion and outcomes. *Circulation* 119.

15

Tabla 1.

20

Biomarcadores conocidos de infarto de miocardio identificados por electroforesis unidimensional y LC-MS / MS del efluente coronario. El recuento espectral normalizado se calculó utilizando el software de Scaffold (Proteomesoftware, v2.0) y la liberación de la proteína se expresó como una relación usando el recuento de control como el denominador y el recuento isquémico como el numerador. "+++" Indica proteínas identificadas en los efluentes coronarios de corazones isquémicos pero no control (el denominador es cero).

Nombre proteínas	Número acceso	Peso molecular (kDa)	Péptido único en control	Péptido único en isquemia	Relación isquemia / control
Troponina I, músculo cardíaco	TNNI3_MOUSE	24	0	66	+++
Troponina T, músculo cardíaco	TNNT2_MOUSE	36	0	5	+++
Troponina C, y músculos cardíacos equeléticos bajos	TNNC1_MOUSE	18	0	11	+++
Creatina quinasa tipo B	KCRB_MOUSE	43	6	24	4,0
Creatina quinasa tipo M	KCRM_MOUSE	43	37	306	8,3
Proteína de unión a ácidos grasos, corazón	FABPH_MOUSE	15	6	68	11,3

Cadena Lactato deshidrogenasa A	L-LDHA_MOUSE	36	31	205	6,6
Cadena Lactato deshidrogenasa B	L-LDHB_MOUSE	37	56	349	6,2
Mioglobina	MYG_MOUSE	17	45	237	5,3
Miosina cadena ligera 1, isoforma del músculo esquelético	MLE1_MOUSE	21	0	4	+++
Miosina cadena ligera 3,	MYL3_MOUSE	22	5	26	5,2
Alfa-enolasa	ENOA_MOUSE	47	39	49	1,3
Beta-enolasa	ENOB_MOUSE	47	59	206	3,5

Tabla 2.

Biomarcadores conocidos de infarto de miocardio identificados por electroforesis bidimensional. Se midió la intensidad de fluorescencia (Cy3 y Cy5) para cada mancha y la relación se calculó usando Cy5 como numerador y Cy3 como denominador para expresar la liberación después de la isquemia como una relación de ésta con perfusión de control emparejado.

5

Identificación de la mancha	Nombre proteínas	Número acceso	Peso molecular (kDa)	Veces isquemia / control
55	Troponina T	TNNT2_MOUSE	35	4,5
187	Troponina C	TNNC1_MOUSE	18	4,23
56	Creatina quinasa tipo B	KCRB_MOUSE	42	4,5
69	Creatina quinasa tipo M	KCRM_MOUSE	43	15,3
71	Creatina quinasa tipo M	KCRM_MOUSE	43	15,1

83	Cadena L-Lactato deshidrogenasa B	LDHB_MOUSE	36	8,2
84	Cadena L-Lactato deshidrogenasa B	LDHB_MOUSE	36	17,9
107	Cadena L-Lactato deshidrogenasa A	LDHA_MOUSE	36	7,0
108	Cadena L-Lactato deshidrogenasa A	LDHA_MOUSE	36	4,8
138	Miosina polipéptido ligero 3	MYL3_MOUSE	22	10,1
184	Mioglobina	MYG_MOUSE	17	20,7
185	Mioglobina	MYG_MOUSE	17	22,7
192	Proteína de unión a ácidos grasos, corazón	FABPH_MOUSE	14	9,4
193	Proteína de unión a ácidos grasos, corazón	FABPH_MOUSE	14	14,2
194	Proteína de unión a ácidos grasos, corazón	FABPH_MOUSE	14	11,1
195	Proteína de unión a ácidos grasos, corazón	FABPH_MOUSE	14	20,4

Tabla 3.

Proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo que se identificaron en efluentes coronarios usando enfoque basado en 1D ó 2D. La variación en veces se calculó como se describe en las Tablas 1 y 2.

	Nombre proteína	Número acceso	Peso molecular (kDa)	Veces isquemia control /
Gel 1D	Aflatoxina B1 aldehído reductasa elemento 2	ARK72_MOUSE	41	+++

ES 2 526 994 T3

Caltasa		CATA_MOUSE	60	0,6
Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn]		SODE_MOUSE	27	4,0
Glutarredoxina 3		GLRX3_MOUSE	38	+++
Glutarredoxina 3		GLRX3_MOUSE	38	+++
Glutación peroxidasa 1		GPX1_MOUSE	22	0,7
Glutación peroxidasa 3		GPX3_MOUSE	25	1,9
Glutación reductasa		GSHR_MOUSE	54	2,3
Glutación transferasa A4	S-	GSTA4_MOUSE	26	3,6
Glutación transferasa Mu 1	S-	GSTM1_MOUSE	26	5,2
Glutación transferasa Mu 2	S-	GSTM2_MOUSE	26	5,7
Glutación transferasa Mu 5	S-	GSTM5_MOUSE	27	+++
Glutación transferasa Mu 7	S-	GSTM7_MOUSE	26	2,0
Glutación transferasa P 1	S-	GSTP1_MOUSE	24	4,5
Glutación S-sintetasa		GSHB_MOUSE	52	+++
Metionina-R-sulfóxido reductasa B3		MSRB3_MOUSE	20	+++
Péptido metionina sulfóxido reductasa de péptido		MSRA_MOUSE	26	9,0

ES 2 526 994 T3

Gel 2D	Peroxirredoxina 1	PRDX1_MOUSE	22	4,3
	Peroxirredoxina 2	PRDX2_MOUSE	22	3,9
	Peroxirredoxina 5	PRDX5_MOUSE	22	3,8
	Peroxirredoxina 6	PRDX6_MOUSE	25	5,0
	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	SODC_MOUSE	16	1,7
	Tiorredoxina	THIO_MOUSE	12	2,0
	Proteína 17 que contiene dominio tiorredoxina	TXD17_MOUSE	14	+++
	Tiorredoxina reductasa citoplásmica 1,	TRXR1_MOUSE	67	+++
	Xantina deshidrogenasa / oxidasa	XDH_MOUSE	147	1,4
	Glutarredoxina 3	GLRX3_MOUSE	38	2,7
	Hidroxiacilglutación	GL02_MOUSE	29	2,4
	Peroxirredoxina 1	PRDX1_MOUSE	22	3,8
	Peroxirredoxina 2	PRDX2_MOUSE	22	8,0
	Peroxirredoxina 5, precursor mitocondrial	PRDX5_MOUSE	22	20,7
	Peroxirredoxina 6	PRDX6_MOUSE	25	16,2
	Peroxirredoxina 6	PRDX6_MOUSE	25	7,5
Peroxirredoxina 6	PRDX6_MOUSE	25	6,4	

	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	SODC_MOUSE	16	8,1
	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	SODC_MOUSE	16	4,8
	Tiorredoxina	THIO_MOUSE	12	2,0

Tabla 4.

Las proteínas liberadas en el efluente coronario en abundancia similar y con selectividad de isquemia similar, como biomarcadores establecidos conocidos como biomarcadores aparecen en rojo y los biomarcadores candidatos potenciales en negro. Se ha usado un límite de enriquecimiento de 5 veces en el efluente post-isquémico.

5

Identificación de la proteína	Nombre proteína	Número acceso	Veces isquemia / control	Función
14	Cadena L-Lactato deshidrogenasa B	LDHB_MOUSE	6,2	Glicólisis
17	Mioglobina	MYG_MOUSE	5,3	Almacenaje / transporte de oxígeno
22	Creatina quinasa tipo M	KCRM_MOUSE	8,3	Transducción de energía
28	Cadena L-Lactato deshidrogenasa A	LDHA_MOUSE	6,6	Glicólisis
31	Malato deshidrogenasa citoplásmica	MDHC_MOUSE	8,0	Glicólisis
32	Fructosa – bifosfato aldolasa A	ALDOA_MOUSE	5,0	Glicólisis
39	Triosefosfato isomerasa	TPIS_MOUSE	6,3	Glicólisis
46	Fosfoglucomutasa - 1	PGM1_MOUSE	5,6	Glicólisis
47	Vinculina	VINC_MOUSE	7,1	Proteína de adhesión
57	Factor 1 de elongación alfa 1	EF1A1_MOUSE	5,8	Biosíntesis de la proteína

ES 2 526 994 T3

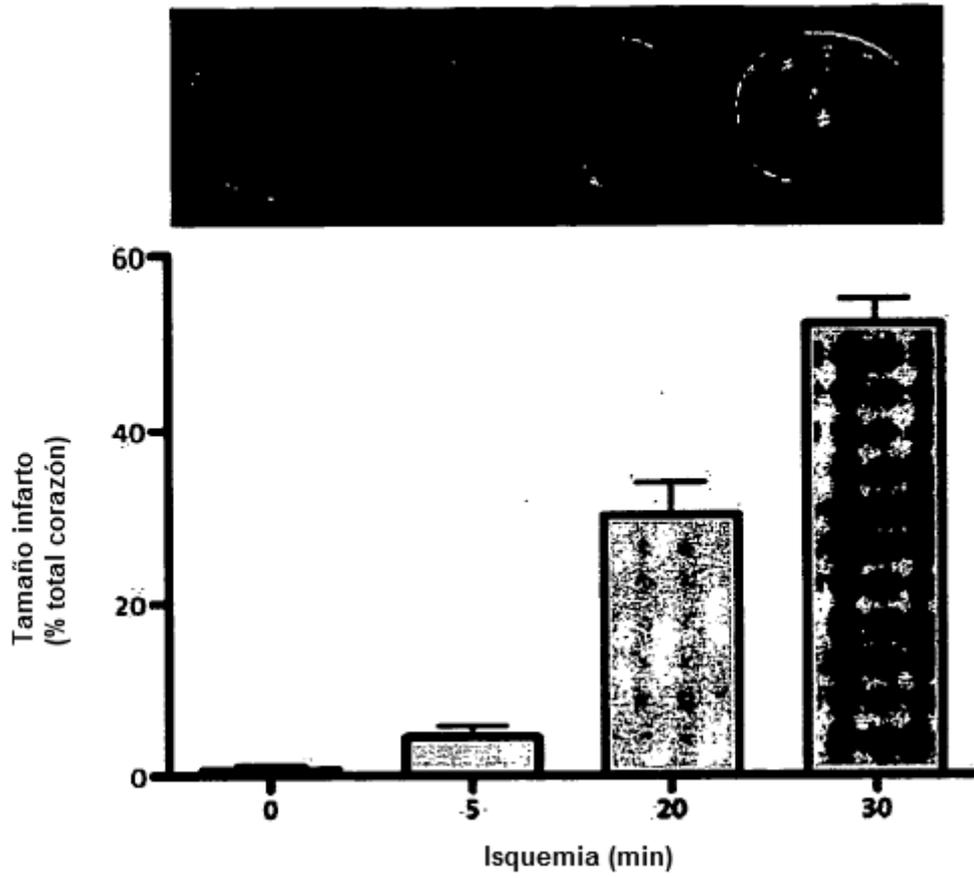
65	Glutación S-transferasa Mu 1	GSTM1_MOUSE	5,2	Detoxicación de ROS
66	Proteína 1 de unión a selenio	SBP1_MOUSE	9,5	Proteína antioxidante
71	Adenosilhomocisteinasa	SAHH_MOUSE	5,4	Metabolismo adenosina
86	Proteína C de unión a la miosina, tipo cardiaca	MYPC3_MOUSE	19,3	Proteínas asociadas a los filamentos gruesos
93	Creatina quinasa tipo B	KCRB_MOUSE	4,0	Transducción de energía
95	Glutación S-transferasa Mu 2	GSTM2_MOUSE	5,7	Transducción de energía
96	Proteína 2 de 70 kDa relacionada con el choque cardiaco	HSP72_MOUSE	6,0	Proteína chaperona
97	Proteína de unión a ácidos grasos, corazón	FABPH_MOUSE	11,3	Transporte de ácidos grasos
98	Factor de elongación 2	EF2_MOUSE	11,7	Proteína de translocación
111	Miosina cadena ligera 3 de	MYL3_MOUSE	5,2	(Ribosoma) Proteínas del filamento
112	Precursor del proteasoma subunidad beta tipo 5	PSB5_MOUSE	7,6	Proteasoma
113	Proteína 1 que contiene repeticiones WD	WDR1_MOUSE	9,4	Desensamblaje del filamento de actina

REIVINDICACIONES

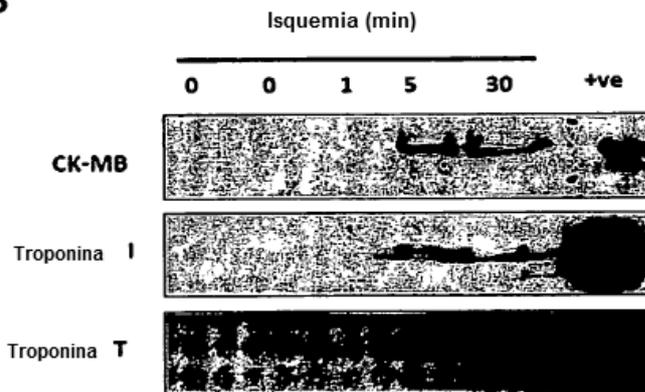
1. Un procedimiento de diagnóstico de lesión cardiaca que comprende identificar una concentración elevada de proteína C de unión a la miosina cardíaca (cMyBP-C) o un fragmento de la misma en una muestra obtenida de un sujeto.
- 5 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la lesión cardiaca es infarto agudo de miocardio o recidiva de infarto.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende la identificación de una concentración elevada de cMyBP-C.
- 10 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende la identificación de una concentración elevada de un fragmento de cMyBP-C.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el fragmento tiene una masa de alrededor de 40 kDa.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en el que el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene homología sustancial con la región CO-C1 de cMyBP-C.
- 15 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra es una muestra de sangre.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la muestra es una muestra de sangre venosa periférica.
- 20 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la muestra es una muestra que se obtuvo dentro de las 24 horas de la aparición de síntomas de la lesión cardiaca.
10. Un kit para el diagnóstico de la lesión cardiaca, que comprende una molécula de unión marcada que se une específicamente a la cMyBP-C y una molécula de unión marcada que se une específicamente a un fragmento de cMyBP-C.

Figura 1

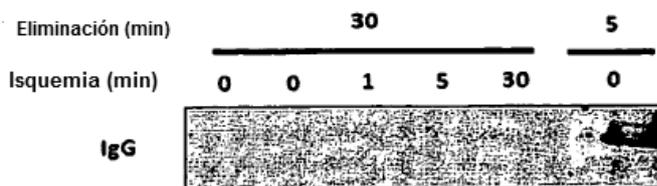
A



B



C



D



Figura 2

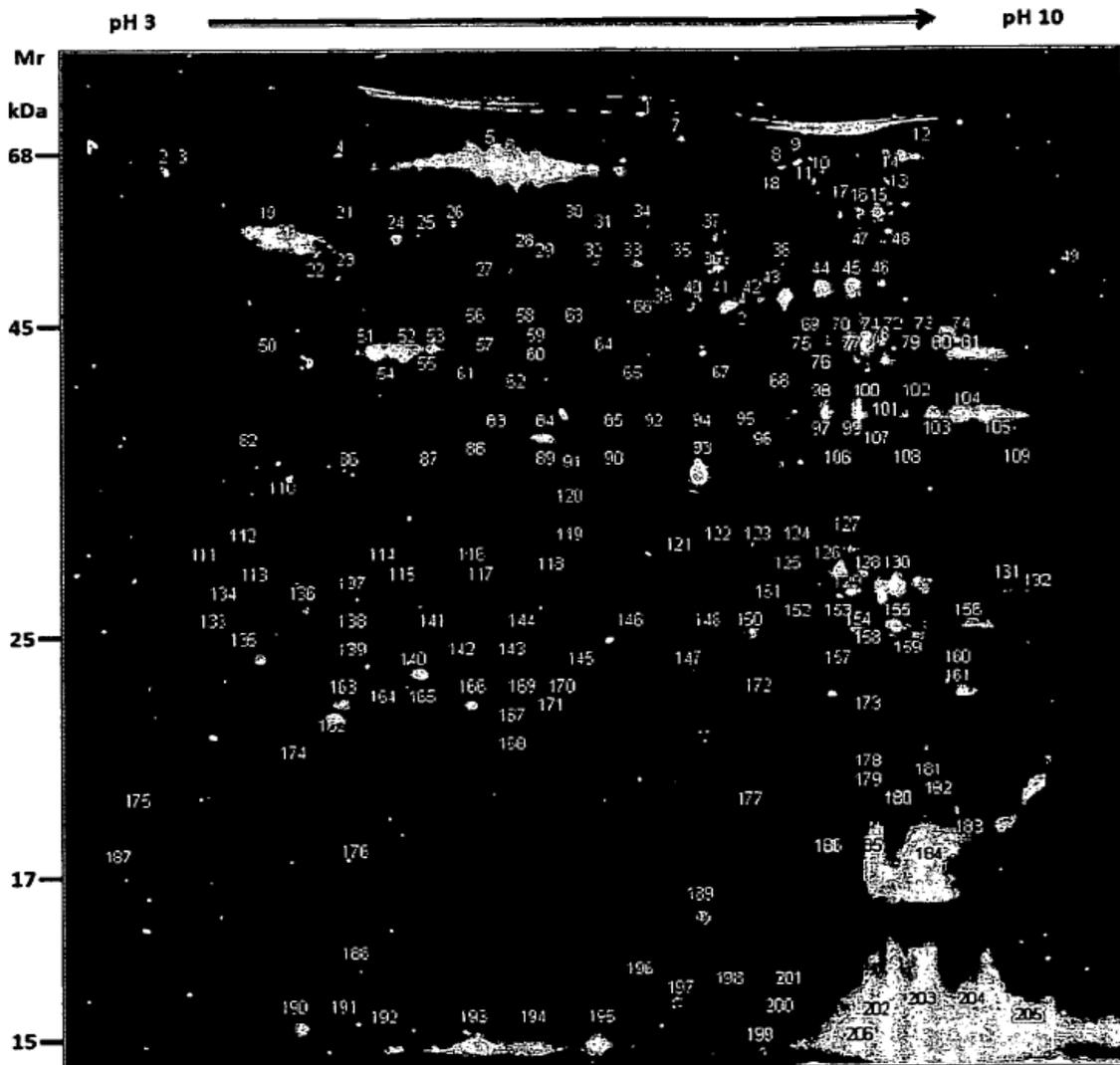


Figura 3

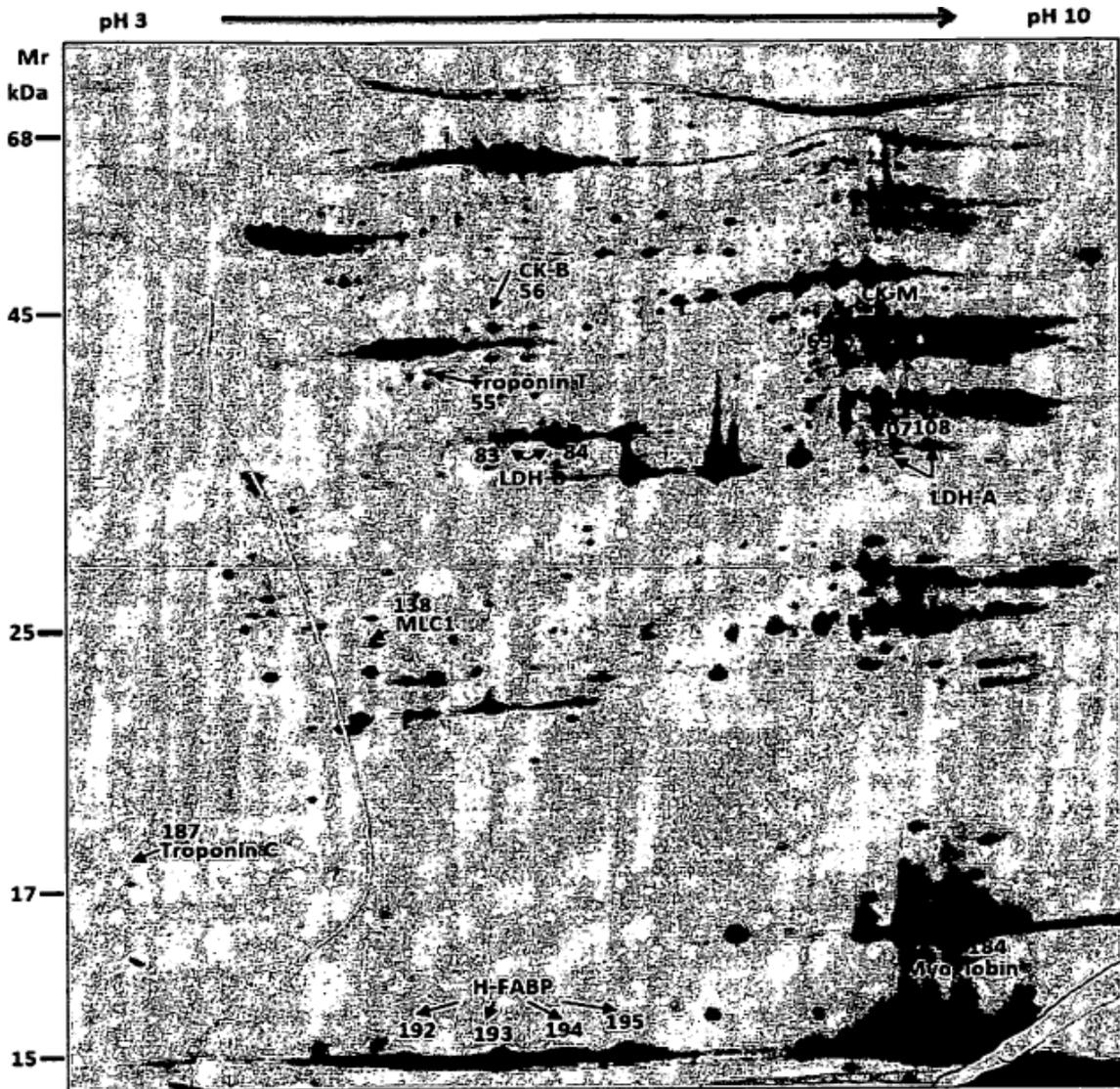


Figura 4

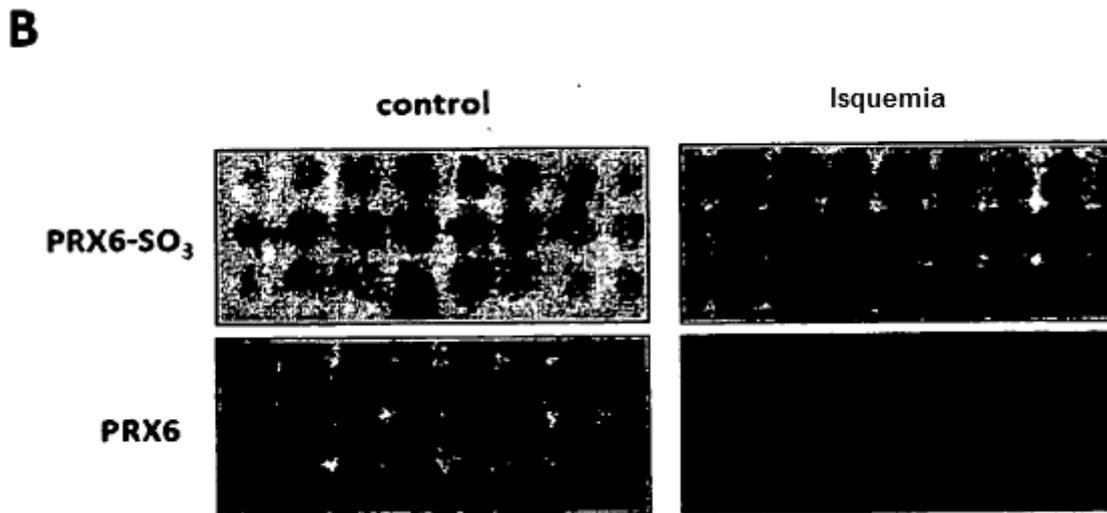
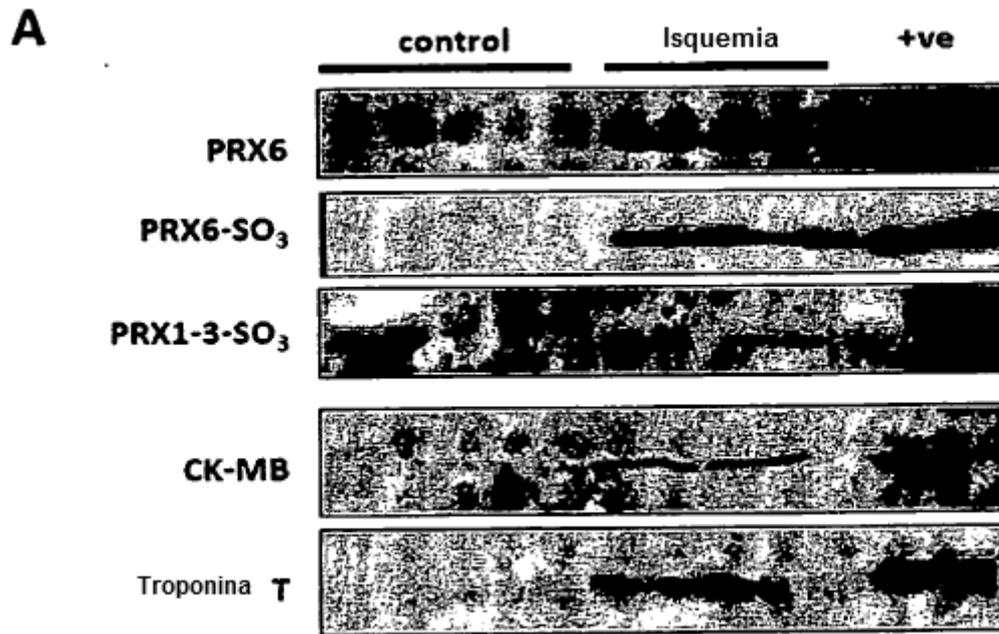


Figura 5

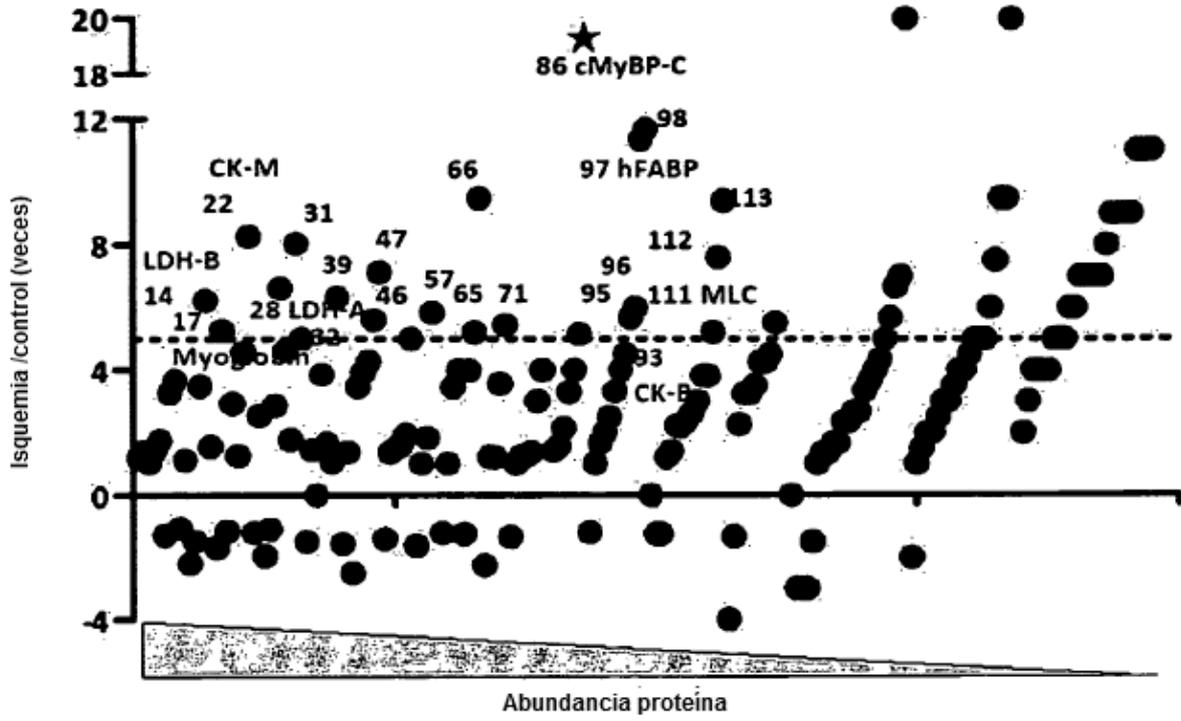


Figura 6

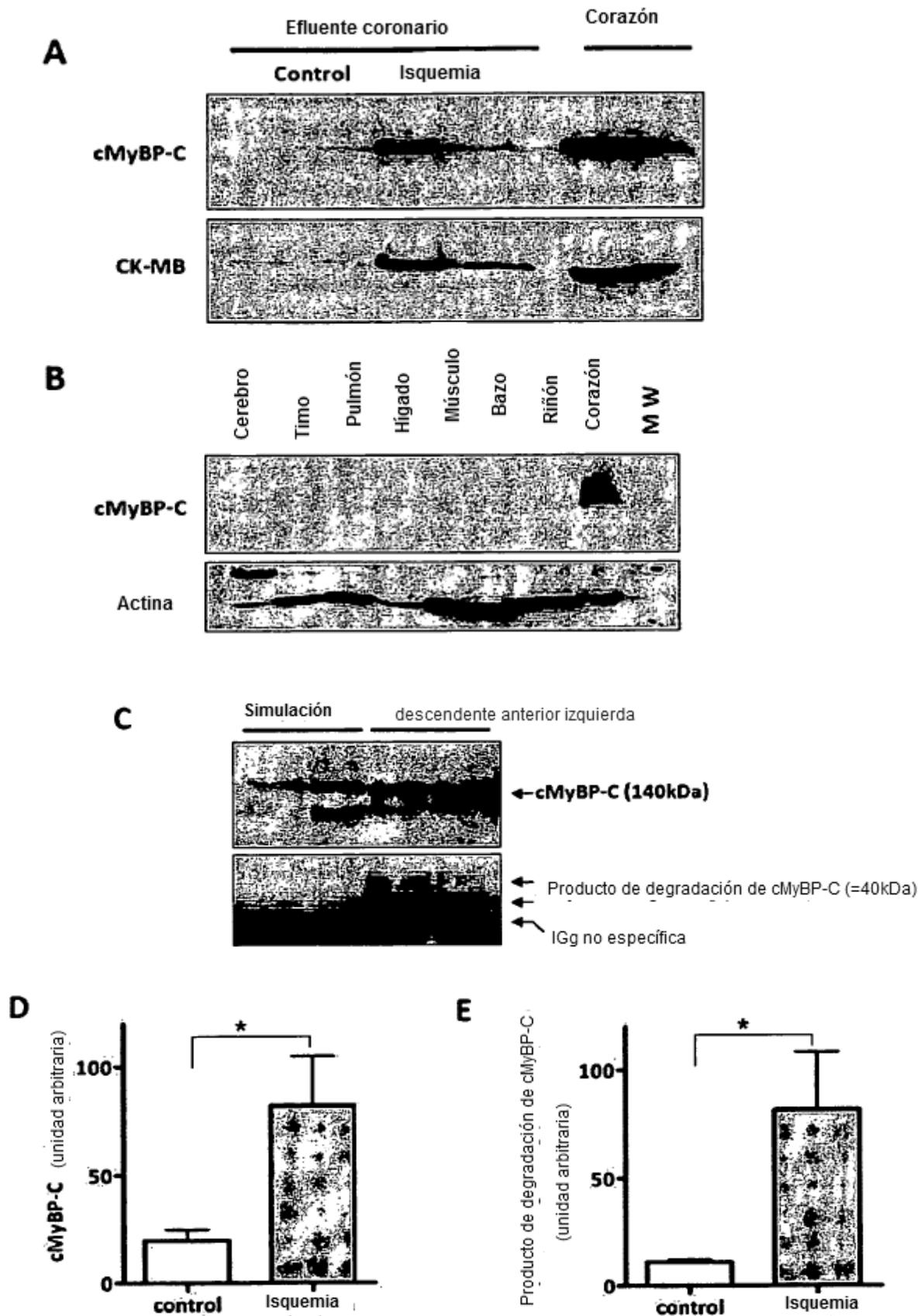


Figura 7

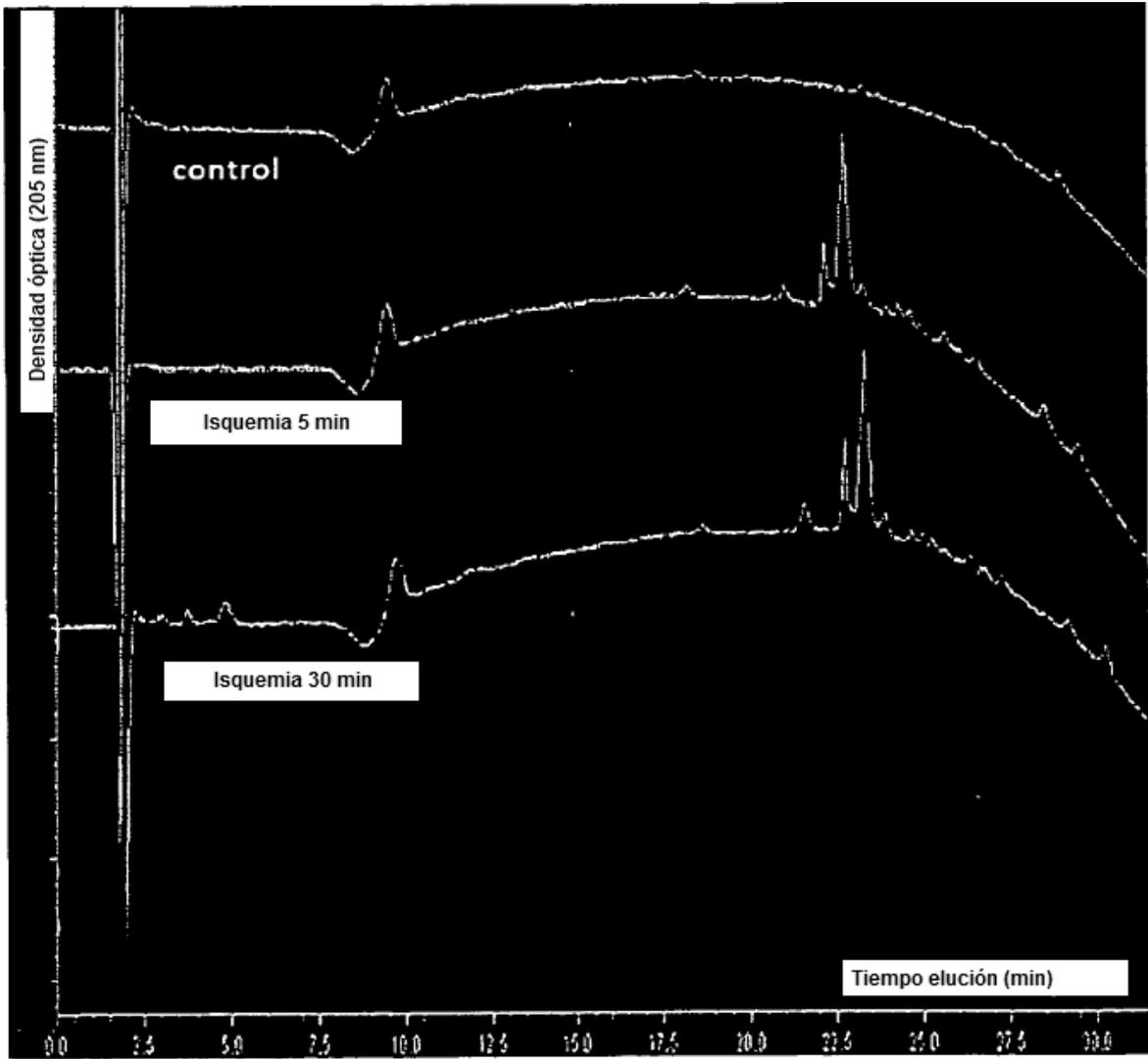
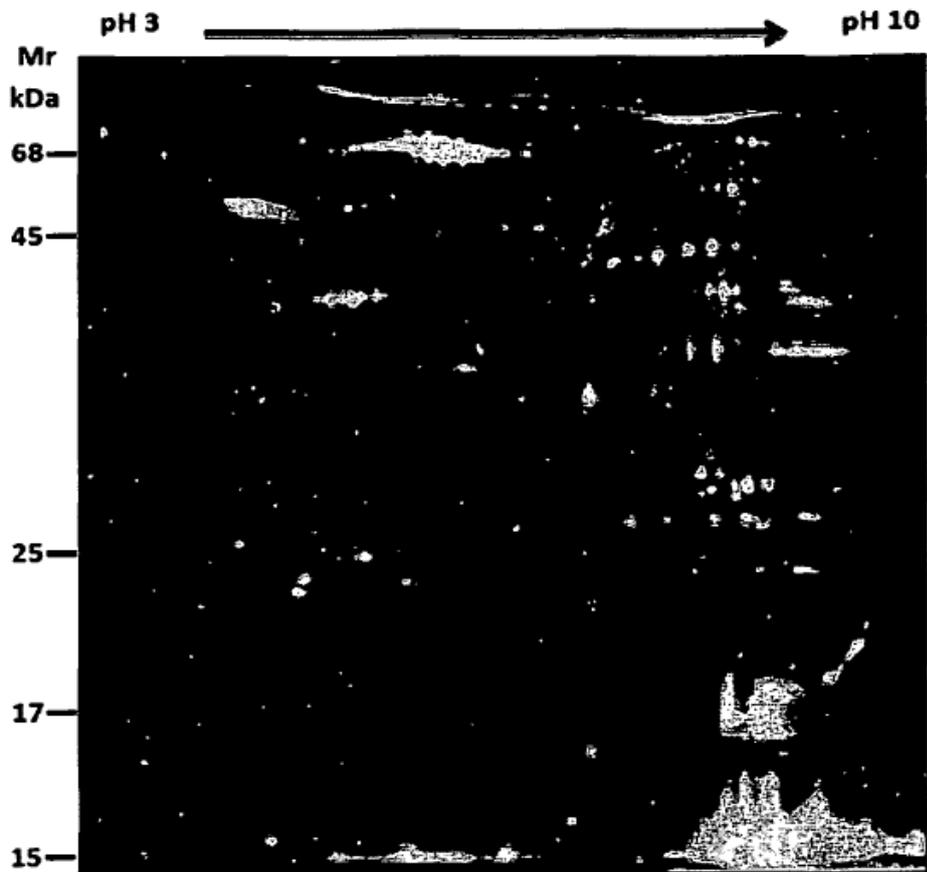


Figura 8

A



B

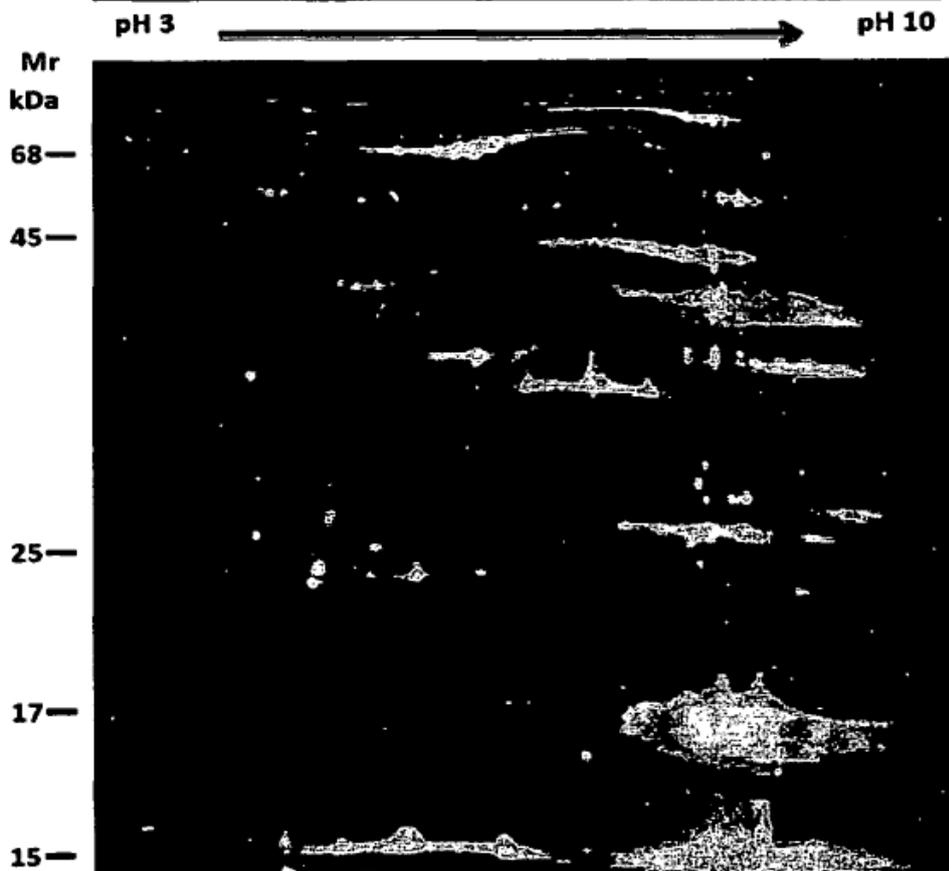
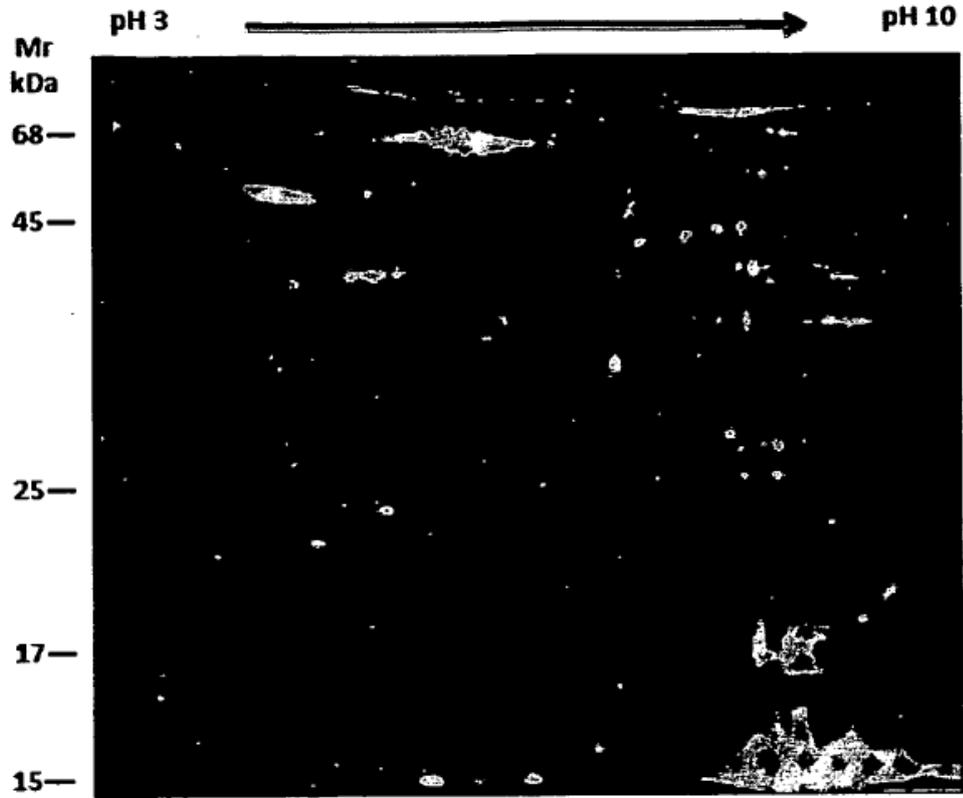


Figura 9

A



B

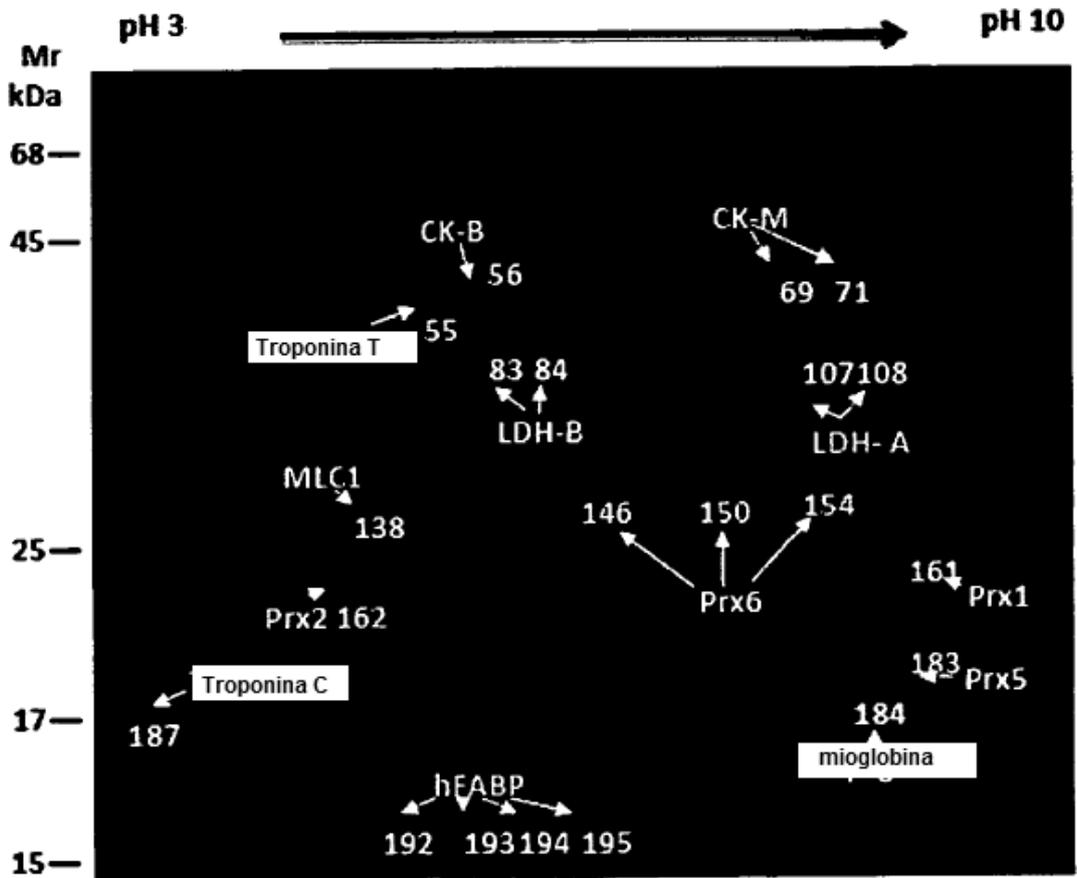


Figura 10

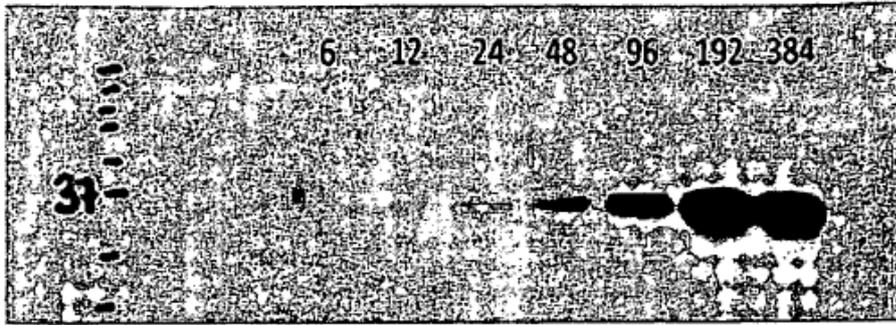


Figura 11

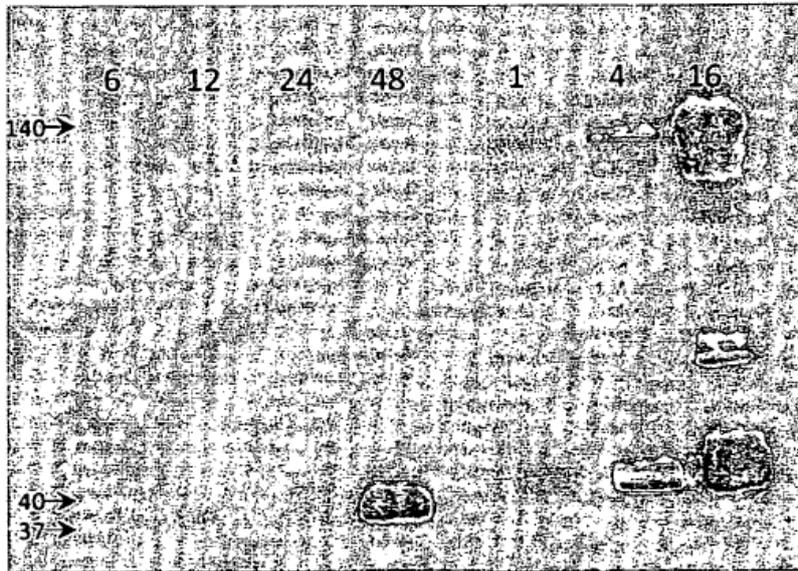


Figura 12

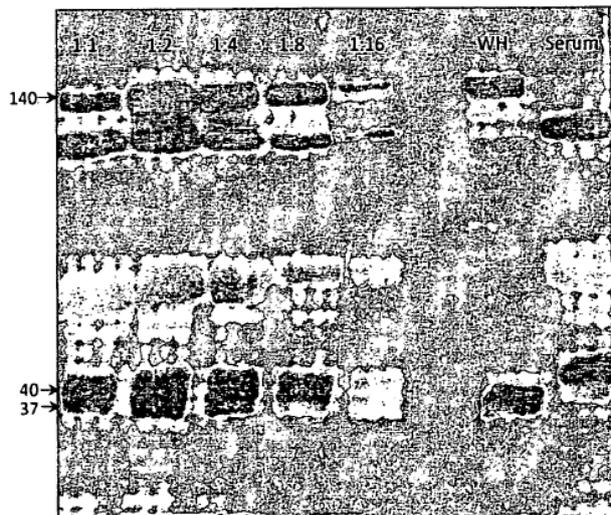


Figura 13

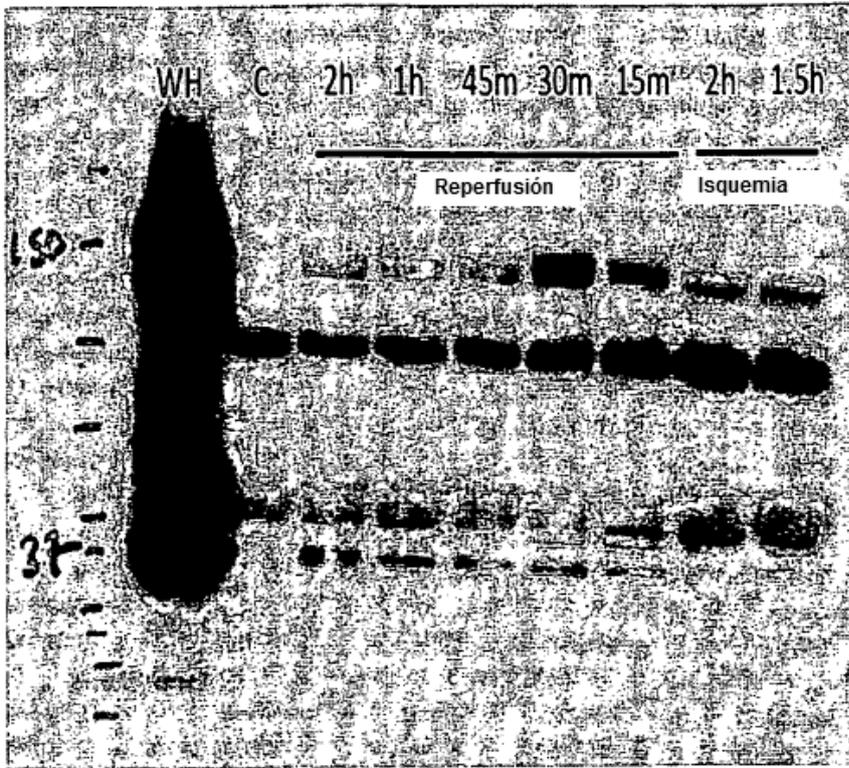


Figura 14

