

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 908**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2013 PCT/BR2013/000202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13185194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13731026 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2859354**

54 Título: **Troponina I cardíaca nitrada como biomarcador de isquemia cardíaca**

30 Prioridad:

11.06.2012 US 201213493488

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2017

73 Titular/es:

FLEURY S/A (50.0%)

**Av. General Valdomiro de Lima 508, Jabaquara
04344-903 São Paulo - SP, BR y
FUNDAÇÃO ZERBINI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VENTURINI DA SILVA, GABRIELA;
DA COSTA PEREIRA, ALEXANDRE;
KRIEGER, JOSÉ EDUARDO;
SCHETCHMAN, DEBORA;
LEMONS, PEDRO;
MIKE TSUTSUI, JEANE;
MELECHCO CARVALHO, VALDEMIR y
MORAIS CARDOZO, KARINA**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 611 908 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

Troponina I cardíaca nitrada como biomarcador de isquemia cardíaca

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de un novedoso biomarcador para isquemia cardíaca: troponina I cardíaca nitrada. La presente invención también proporciona métodos para la identificación y el uso de una troponina cardíaca nitrada como biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y gestión del tratamiento de isquemia cardíaca.
 10 La presente invención se refiere además a péptidos, anticuerpos, composiciones, métodos, técnicas y pruebas para la identificación y la cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en el suero de sujetos.

Antecedentes de la invención

15 Los síndromes agudos coronarios están entre las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. Millones de pacientes se tratan anualmente por dolor de pecho de aparición aguda. En esta situación es extremadamente importante identificar rápidamente cuándo este dolor es debido a isquemia miocárdica de manera que pueda empezarse el cuidado adecuado. La isquemia miocárdica es un estado clínico caracterizado por riesgo sanguíneo reducido al corazón. Actualmente, no hay métodos de diagnóstico eficaces para esta enfermedad.
 20 Actualmente, el diagnóstico se basa en pruebas no invasivas comunes tales como prueba de esfuerzo, escintigrafía de perfusión miocárdica, sin embargo, estas pruebas son caras y tienen sensibilidad y especificidad limitadas (Parikh; Lemos, 2006). Por tanto, una gran parte de los pacientes con isquemia miocárdica no están diagnosticados debido a la ausencia de pruebas de diagnóstico precisas para isquemia miocárdica sin necrosis del músculo del corazón (Pope et al, 2000; McCaig; Burt, 2002; Lloyd-Jones et al, 2009).

25 En los Estados Unidos, la FDA ha autorizado el uso de albúmina modificada con isquemia (IMA) como marcador para isquemia. Este marcador consiste en la pérdida de afinidad de la albúmina por el cobalto después de isquemia miocárdica. Sin embargo, este marcador no es suficientemente específico, ya que se ha mostrado que es elevado en varias situaciones clínicas tales como en insuficiencia renal, accidente cerebrovascular y ejercicio aeróbico de carga elevada (Debashis, et al, 2004; Lippi, et al, 2005; Morrow, et al, 2007; Singh et al, 2010).

30 Recientemente, se ha sugerido el uso de los niveles de troponinas cardíacas citoplásmicas en suero como marcadores para lesión miocárdica. Las troponina cardíacas son específicas para miocitos cardíacos, sin embargo, debido a la alta sensibilidad del ensayo, estas proteínas también son detectables en el suero de pacientes sanos y en otras enfermedades cardíacas, además de síndromes coronarios agudos o situaciones clínicas donde se produce la isquemia miocárdica (Eggers, et al, 2009; Reichlin et al, 2009; Masson et al, 2010; Hochholzer et al, 2011).

35 Así, los marcadores de isquemia cardíaca actualmente disponibles son tanto no específicos debido a que están presentes en otros órganos y tejidos distintos del miocardio, y/o son elevados en otras situaciones clínicas distintas de isquemia miocárdica.

40 Debido a la importante falta de marcadores de isquemia cardíaca, el diagnóstico y el tratamiento temprano pueden producirse en una etapa muy tardía en pacientes con aguda inestable. Por otra parte, en pacientes con dolor de pecho no isquémico, la incertidumbre sobre el diagnóstico puede requerir hospitalización para investigación que produce costes de cuidado sanitario excesivos no deseables.

45 Además de las pruebas de urgencias, un marcador preciso de isquemia miocárdica también es útil en el tratamiento ambulatorio de pacientes en el diagnóstico de angina estable, especialmente en asociación con prueba de esfuerzo o escintigrafía miocárdica de esfuerzo.

50 De forma interesante, enfermedades cardiovasculares, especialmente síndromes agudos coronarios, están fuertemente asociadas a un desequilibrio oxidativo, conduciendo a un aumento de radicales libres y aumentos de especies de oxígeno y nitrógeno reactivas. Así, en tales enfermedades, hay un aumento en la producción de óxido nítrico, superóxido y un cambio en las vías antioxidantes, conduciendo a estrés nitrooxidativo y oxidativo (Levrant et al, 2006; Peluffo, Radi, 2007; Aslan, Dogan, 2011).

55 Como resultado del aumento de estas especies reactivas, se forman especies intermedias tales como peroxinitrito. El peroxinitrito, entre otras acciones, conduce a la formación de proteínas nitradas mediante la adición de un grupo NO₂ al anillo fenólico de los restos de tirosina (Ischiropoulos, 2009).

60 Esta nitración puede alterar la proteína de varias formas: la proteína puede llegar a ser resistente a la degradación, puede activar el sistema inmunitario, puede llegar a inactivarse o puede adquirir una nueva función. Estos cambios en la actividad de la proteína pueden afectar la fisiopatología del sistema cardiovascular (Abello et al, 2009).

65 Se han identificado varias proteínas que están nitradas en diferentes compartimentos del sistema cardiovascular, tales como fibrinógeno, plasmina y Apo-1 en el plasma; Apo-B, ciclooxigenasa, prostaglandina sintasa y Mn-SOD en

las paredes de vasos; creatina cinasa miofibrilar y α -actinina en el miocardio. Estas proteínas nitradas se asociaron a enfermedad cardiovascular (Aslan, Dogan, 2011).

En vista de esto, están surgiendo proteínas nitradas como nuevos marcadores para enfermedad cardiovascular. Sin embargo, la nitración de proteínas también se produce en otras situaciones fisiopatológicas que implican un aumento de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas, tales como en diabetes, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad renal y otras enfermedades asociadas a isquemia / reperfusión e inflamación (Gol et al, 2000; Castegna et al, 2003; Turko et al, 2003, Ahmed et al, 2005; Heffron et al, 2009; Isobe et al, 2009; Choi et al, 2010; Tyther et al, 2011; Piroddi et al, 2011). Así, en la búsqueda de un biomarcador nitrado que es específico para enfermedad cardiovascular es importante que la diana de proteína modificada se exprese sola o principalmente en tejido cardíaco.

Las troponinas son proteínas citoplásmicas que tienen isoformas de músculo cardíaco específico y se encuentran en la circulación en concentraciones muy bajas en sujetos sanos y que tienen su concentración elevada en situaciones de esfuerzo al músculo del corazón, tales como necrosis de los cardiomiocitos. La troponina I cardíaca es una proteína citoplásmica única para los miocitos cardíacos y es una de las tres subunidades que forman el complejo de proteína troponina. Esta subunidad es responsable de sensibilidad al calcio y de regular la contracción de músculo. La troponina I se une a actina e inhibe la actividad de ATPasa de actomiosina en ausencia de calcio (Bhavsar et al, 1996).

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de un novedoso biomarcador para isquemia cardíaca: troponina I cardíaca nitrada. La presente invención también proporciona métodos para la identificación y uso de una troponina cardíaca nitrada como biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y gestión del tratamiento de isquemia miocárdica, con y sin necrosis del músculo del corazón.

El diagnóstico y el pronóstico se realizan determinando la cantidad de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero de sujetos y la relación de troponina I cardíaca nitrada con troponina I cardíaca no nitrada en muestras de suero de sujetos. Este biomarcador puede detectarse por técnicas de inmunoensayo y espectrometría de masas en tándem. La presente invención se refiere además a péptidos, anticuerpos, composiciones, métodos, técnicas y pruebas para la identificación y cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en el suero de sujetos.

En una realización, la presente invención se refiere a la identificación de un novedoso biomarcador para isquemia cardíaca: troponina I cardíaca nitrada.

En una realización, la presente invención proporciona un nuevo marcador útil para el diagnóstico y la cuantificación de isquemia cardíaca y para el diagnóstico y el pronóstico de pacientes con síndrome agudo coronario. La presente invención también proporciona métodos de uso del biomarcador para el diagnóstico y el pronóstico de isquemia cardíaca.

En una realización, la presente invención se refiere a la identificación de troponina I cardíaca nitrada, y al uso de esta molécula o sus fragmentos en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de síndrome agudo coronario. Esta molécula o fragmentos de la misma están presentes en diferentes concentraciones en aquellos individuos que no presentan isquemia miocárdica, en comparación con aquellos que presentan isquemia miocárdica. Esta molécula o fragmentos de la misma están presentes en muestras de pacientes con síndrome agudo coronario en concentraciones que son directamente proporcionales al área afectada por infarto de miocardio isquémico.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para el diagnóstico, pronóstico o selección del mejor método de tratamiento de individuos con síndrome coronario crónico y agudo que incluye: determinar la concentración de moléculas de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de péptido derivados de esta molécula en una muestra, determinar la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos en una serie de muestras individuales, correlacionar la concentración con valores de referencia para diagnosticar y pronosticar y correlacionar con el área de miocardio afectada por isquemia.

En una realización, el método comprende la cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en suero y plasma, y su correlación con los valores de referencia para determinar el diagnóstico de isquemia cardíaca.

En otra realización, el método comprende la cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en suero y plasma y la correlación de los valores observados con el área de miocardio afectada por isquemia.

En otra realización, el método comprende la cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en suero y plasma, y su correlación con los valores de referencia para determinar el pronóstico de isquemia cardíaca.

En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de troponina I cardíaca nitrada con troponina I en muestras de suero o plasma y su correlación con los valores de referencia para determinar el

diagnóstico de isquemia cardíaca.

5 En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de troponina I cardíaca nitrada con troponina I en muestras de suero o plasma y la correlación con los valores de referencia para determinar el pronóstico de isquemia cardíaca.

10 En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de troponina I cardíaca nitrada con troponina I en muestras de suero o plasma y la correlación de los valores con el área afectada por isquemia miocárdica.

En otra realización, el método comprende la cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero o plasma y la correlación con el estado del síndrome agudo coronario.

15 En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de troponina I cardíaca nitrada con troponina I en muestras de suero o plasma y la correlación con el estado del síndrome agudo coronario.

En una realización, el método comprende la cuantificación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero o plasma, y la correlación con valores de referencia para determinar el diagnóstico de isquemia cardíaca.

20 En una realización, el método comprende la cuantificación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero o plasma y la correlación con valores de referencia para determinar el pronóstico de isquemia cardíaca.

25 En otra realización, el método comprende la cuantificación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero o plasma y la correlación de los valores con el área afectada por isquemia miocárdica.

En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de diversos péptidos de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero o plasma y la correlación con los valores de referencia para determinar el diagnóstico de isquemia cardíaca.

30 En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de diversos péptidos troponina I cardíaca nitrada en muestra de suero y plasma y la correlación de los valores con el área de miocardio afectada por isquemia.

En otra realización, el método comprende la cuantificación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada en muestra de suero y plasma y la correlación con el estado de síndrome agudo coronario.

35 En otra realización, el método comprende la cuantificación de las relaciones de diversos péptidos de troponina I cardíaca nitrada en muestras de suero o plasma y la correlación con el estado del síndrome agudo coronario.

40 En algunas realizaciones, el método comprende la cuantificación de la relación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca péptidos en muestras de suero o plasma y la correlación con los valores de referencia para diagnosticar isquemia cardíaca.

45 En algunas realizaciones, el método comprende la cuantificación de la relación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada con péptidos de troponina I cardíaca en muestras de suero y plasma que se correlacionan con los valores con el área de miocardio afectada por isquemia.

50 En otra realización, el método comprende la cuantificación de la relación de péptidos de troponina I cardíaca nitrada con péptidos de troponina I cardíaca en muestras de suero o plasma y la correlación con el estado de síndrome agudo coronario.

55 La invención proporciona varios métodos diferentes de cuantificación del biomarcador para diagnosticar, pronosticar y el estado de isquemia cardíaca. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, la cuantificación del biomarcador se realiza por digestión enzimática, seguido de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (TQS de cuadrupolo).

En otra realización, la cuantificación de biomarcadores se realiza por cromatografía de líquidos seguido de digestión y análisis por CL-TQS.

60 En algunas realizaciones de la invención, el biomarcador de la invención puede cuantificarse por inmunoensayo o espectrometría de masas. En una realización, la invención proporciona un inmunoensayo que comprende una molécula de anticuerpo específica para troponina I cardíaca y fragmentos de péptido nitrado específicos para troponina I cardíaca nitrada. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico para una región específica de la troponina I cardíaca nitrada, que contiene la porción del biomarcador nitrado. Por ejemplo, la porción de troponina I cardíaca nitrada puede detectarse específicamente sin reactividad cruzada con la troponina I no nitrada. Este inmunoensayo permite la detección de la molécula de proteína nitrada completa y del fragmento específico que contiene la nitración.

65

- 5 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo específico para la región comprende los aminoácidos 16-35 de la troponina I cardíaca nitrada. En algunas realizaciones del método, el anticuerpo usado para detectar la troponina I cardíaca nitrada es policlonal. En algunas realizaciones del método, el anticuerpo usado para detectar la troponina I cardíaca nitrada es monoclonal.
- 10 En algunas realizaciones, el método incluye la captura de troponina I cardíaca nitrada o péptidos de troponina I cardíaca nitrada. En algunas realizaciones de la invención, la captura puede realizarse usando perlas paramagnéticas. En algunas realizaciones de la invención, la captura de la molécula se logra usando un anticuerpo. En algunas realizaciones de la invención, la molécula se captura usando un anticuerpo monoclonal específico para la región que comprende los aminoácidos 16-35 de troponina I cardíaca nitrada. En algunas realizaciones de la invención, la captura de la molécula se logra por cromatografía en columna.
- 15 En una realización, la invención proporciona métodos de determinación de la evolución del síndrome agudo coronario cuantificando la troponina I cardíaca nitrada y sus péptidos, y cuantificando la relación de troponina I cardíaca nitrada y troponina I total en un primer momento y comparando con los valores obtenidos en un segundo momento después de la intervención farmacológica o quirúrgica, o de monitorización de la progresión de la enfermedad.
- 20 En otra realización, la invención proporciona métodos de monitorización de ecocardiograma acompañados de alguna forma de esfuerzo farmacológico o físico. En esta realización, la cantidad de troponina I cardíaca nitrada puede determinarse antes del inicio del examen, durante y después de la prueba. Esta realización también puede realizarse determinando la cantidad de péptidos de troponina I cardíaca nitrada. En esta realización, también es posible cuantificar la relación de troponina I cardíaca nitrada y la troponina I cardíaca total en las muestras.
- 25 En otra realización, la invención proporciona métodos de monitorización de escintigrafía de miocardio acompañados de alguna forma de esfuerzo farmacológico o físico. En esta realización, la cantidad de troponina I cardíaca nitrada puede determinarse antes del inicio del examen, durante y después de la prueba. Esta realización también puede realizarse determinando la cantidad de péptidos de troponina I cardíaca nitrada. En esta realización, también es posible cuantificar la relación de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca total en las muestras.
- 30 En otra realización, la invención proporciona métodos de monitorización de resonancia magnética nuclear del miocardio acompañados de alguna forma de esfuerzo farmacológico o físico. En esta realización, la cantidad de troponina I cardíaca nitrada puede determinarse antes del inicio del examen, durante y después de la prueba. Esta realización también puede realizarse determinando la cantidad de péptidos de troponina I cardíaca nitrada. En esta realización, también es posible cuantificar la relación de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca total en las muestras.
- 35 En otra realización, la invención proporciona métodos de monitorización de pruebas de ergometría. En esta realización, la cantidad de troponina I cardíaca nitrada puede determinarse antes del inicio del examen, durante y después de la prueba. Esta realización también puede realizarse determinando la cantidad de péptidos de troponina I cardíaca nitrada. En esta realización, también es posible cuantificar la relación de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca total en las muestras.
- 40 En algunas realizaciones de la invención, la muestra es sangre, suero o plasma.
- 45 En algunas realizaciones de la invención, el diagnóstico, pronóstico o el método de tratamiento es un diagnóstico, pronóstico o definición de tratamiento para infarto de miocardio.
- 50 En algunas realizaciones de la invención el diagnóstico, pronóstico o método para el tratamiento proporciona una estratificación de riesgo para el nivel de riesgo de infarto de miocardio.
- 55 En algunas realizaciones de la invención, el método de diagnóstico, pronóstico o el método de tratamiento proporciona una estratificación de riesgo para el nivel de riesgo de muerte.
- 60 En algunas realizaciones de la invención, la concentración o intervalo de concentraciones de troponina I cardíaca nitrada proporciona el diagnóstico de isquemia miocárdica si el individuo tiene uno o más síntomas de isquemia miocárdica.
- 65 En algunas realizaciones de la invención, estos síntomas pueden comprender dolor y / o presión en el pecho, ECG anormal, falta de aliento o niveles anormales de enzimas.
- En algunas realizaciones de la invención, el método de determinación de la concentración en muestras de individuos se realiza comparando los valores encontrados para troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de péptidos de troponina I cardíaca nitrada con una curva patrón de concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada purificada o fragmentos de troponina I cardíaca nitrada.
- En algunas realizaciones de la invención, el método de determinación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de troponina I cardíaca nitrada en muestras de individuos se realiza comparando los valores encontrados para troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de péptidos con troponina I cardíaca nitrada con una

curva patrón de concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada purificada o fragmentos de troponina I cardíaca nitrada.

5 En algunas realizaciones de la invención, el método de determinación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de troponina cardíaca nitrada en muestras de individuos se realiza comparando los valores encontrados para troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de péptidos de troponina I cardíaca nitrada con un patrón interno de concentraciones conocidas. En algunas realizaciones, el patrón interno consiste en el péptido AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) isotópicamente marcado con ^{13}C y ^{15}N .

10 En algunas realizaciones de la invención, el método de determinación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de troponina cardíaca nitrada en muestras de individuos se realiza comparando los valores encontrados para troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de péptidos de troponina I cardíaca nitrada con un patrón interno de concentraciones conocidas. En algunas realizaciones, el patrón interno consiste en la troponina I cardíaca nitrada isotópicamente marcada con ^{13}C y ^{15}N .

15 En algunas realizaciones de la invención, el cambio en los niveles de troponina I cardíaca nitrada puede indicar síndrome agudo coronario. En algunas realizaciones de la invención, el cambio en los niveles de troponina I cardíaca nitrada puede indicar enfermedad crónica coronaria. En algunas realizaciones de la invención, el cambio en los niveles de troponina I cardíaca nitrada puede indicar cardiotoxicidad.

20 La invención se refiere además al uso de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma como marcador en el diagnóstico y pronóstico de isquemia cardíaca y de síndrome agudo coronario.

25 En el contexto de la presente invención, isquemia cardíaca se refiere a, pero no se limita a, isquemia cardíaca aguda, isquemia cardíaca crónica, enfermedad crónica coronaria y síndrome agudo coronario.

En el contexto de la presente invención, síndrome agudo coronario se refiere a, pero no se limita a, angina inestable, infarto de miocardio sin elevación del segmento ST e infarto de miocardio con elevación del segmento ST.

30 La presente invención también se refiere a un kit para diagnosticar isquemia cardíaca y/o síndrome agudo coronario, que comprende una troponina cardíaca nitrada y/o troponina I cardíaca aisladas o fragmentos de las mismas, y un sistema para detectar el péptido unido a un anticuerpo para dicho péptido y/o un sustrato para inmovilizar el péptido.

35 Breve descripción de los dibujos

Los anteriores aspectos y muchas de las ventajas adjuntas de la presente invención se apreciarán más fácilmente a medida que la misma se entiende mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se toma conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

40 La FIG. 1 es una electroforesis en gel al 12 % de SDS-PAGE que muestra proteínas nitradas enriquecidas del suero. MW - marcador de peso molecular. kDa - kiloDaltons. 1 - proteínas del suero nitradas del animal de control. 2 - proteínas del suero nitradas del animal con isquemia miocárdica.

45 La FIG. 2 muestra una detección por transferencia Western de troponina I cardíaca nitrada (25 kDa) en una muestra de suero de cerdo después de isquemia miocárdica. Proteínas nitradas enriquecidas del suero. MW - marcador de peso molecular. kDa - kiloDaltons. 1 - proteínas del suero nitradas del animal de control; 2 - proteínas del suero nitradas del animal con isquemia miocárdica.

La FIG. 3 muestra una angiografía de la arteria coronaria circunfleja izquierda a) pre-oclusión y b) post-oclusión.

50 La FIG. 4 muestra la dosificación de marcadores de necrosis cardíaca. A) Concentraciones promedio de troponina T circulante en animales isquémicos; B) concentraciones promedio de CK circulante; C) mediciones de troponina T ultrasensible promedio de animales isquémicos. Las líneas de puntos indican los valores de referencia (Troponina T: 0,1 ng/ml, CK: 5 ng/ml, troponina T ultrasensible: 0,014 ng/ml).

55 La FIG. 5 muestra una detección por transferencia Western de troponina I cardíaca nitrada (25 kDa) en una muestra de suero de cerdo recogida después de la isquemia y reperfusión del corazón. 0 - Antes de la inducción de isquemia, IS - Inmediatamente después de la reperfusión, 10, 30, 60, 90, 120, 180 - minutos después de la reperfusión.

La FIG. 6 muestra una detección por transferencia Western de la troponina I cardíaca nitrada (25 kDa) en una muestra de suero de cerdo después de infarto agudo de miocardio. Troponina I cardíaca purificada, 0 - Antes de la inducción de isquemia, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 - minutos después del infarto agudo de miocardio. El área resaltada indica las muestras con resultados positivos.

60 La FIG. 7 muestra la dosificación de marcadores circulantes de necrosis cardíaca en pacientes después de la inducción de isquemia por implante de prótesis endovascular. A) Promedio de troponina I. B) Promedio de troponina T ultra-sensible. Las líneas de puntos indican los valores de referencia (Troponina I: 0,160 ng/ml, troponina T ultrasensible: 0,014 ng/ml).

65 La FIG. 8 muestra una detección por transferencia Western de troponina I cardíaca nitrada (25 kDa) en muestra de suero de paciente después de isquemia inducida. Tiempo 0 - Antes de la inducción de isquemia; tiempos 1, 30, 60, 120, 180 minutos después de la isquemia. El área resaltada indica las muestras con resultados positivos.

Los resultados demuestran que, en pacientes con angina, antes de la inducción de isquemia, no era posible detectar la troponina I cardíaca nitrada en el suero. La proteína se identificó después de la inducción de isquemia y siguió en el suero hasta 3 horas desde el evento isquémico.

5 La FIG. 9 muestra la co-localización de troponina I cardíaca y nitrotirosina por inmunofluorescencia en cultivo de cardiomiocitos isquémicos. En azul marcado de los núcleos (DAPI), verde marcando troponina I cardíaca, rojo marcando nitrotirosina y en mezcla superposición de las marcas. Izquierda: indicación del tiempo de isquemia en minutos. Fotos tomadas en confocal. Aumento de 63x.

10 La FIG. 10 muestra el marcado de troponina I cardíaca y nitrotirosina por inmunofluorescencia en tejido cardíaco de modelos animales. En azul marcado de los núcleos (DAPI), verde marcando troponina I cardíaca, rojo marcando nitrotirosina y en mezcla superposición de las marcas. Izquierda: indicación del animal de control, animal con isquemia miocárdica y animal con infarto de miocardio. Fotos tomadas en confocal. Aumento de 63x.

La FIG. 11 muestra la digestión de troponina I cardíaca nitrada por tripsina. FIG. 11A, Péptidos secuenciados de troponina I nitrada. FIG. 11B, Mapa de cobertura de troponina I cardíaca nitrada.

15 La FIG. 12 muestra la estructura del péptido PAPIRRRSSNY(NO₂) RAY(NO₂)ATEPHA (SEQ ID NO:4) usado para el desarrollo del anticuerpo anti-troponina I cardíaca nitrada. Se demuestra un resto de tirosina nitrado en la estructura.

La FIG. 13 muestra un cromatograma de la purificación del péptido PAPIRRRSSNY(NO₂) RAY(NO₂)ATEPHA (SEQ ID NO:4) nitrado por HPLC.

20 Descripción detallada de la invención

Troponina I cardíaca nitrada como biomarcador para isquemia miocárdica y síndrome agudo coronario

25 El biomarcador de la presente invención, troponina I cardíaca nitrada, se caracterizó por inmunoprecipitación seguido de detección de troponina I cardíaca nitrada por transferencia Western.

30 Primero, los presentes inventores realizaron el enriquecimiento de proteínas del suero nitradas por inmunoprecipitación usando anticuerpo anti-nitrotirosina (Parastatidis, I et al, 2007 modificado). Entonces, las proteínas del suero nitradas se cargaron sobre electroforesis en gel SDS-PAGE, seguido de transferencia a membrana de PVDF. La membrana se incubó entonces con anti-troponina I cardíaca, que mostró tinción positiva para troponina I cardíaca.

35 La troponina I cardíaca nitrada de la presente invención puede caracterizarse adicionalmente por la detección de fragmentos de péptidos por espectrometría de masas ESI-TQ acoplada a cromatografía de líquidos. Estas características proporcionan un método de determinación de la presencia y concentración de esta proteína en muestras biológicas.

40 La troponina cardíaca nitrada también puede caracterizarse por inmunoensayo con anticuerpo monoclonal específico para troponina I cardíaca nitrada. Este método también se usa para determinar las concentraciones de muestras de troponina I cardíaca nitrada de individuos.

El biomarcador de la presente invención puede detectarse de varias formas y en diferentes tipos de muestras biológicas.

45 Las troponinas I cardíacas nitradas se detectaron preferencialmente en suero o plasma de individuos por técnicas de inmunoensayo o espectrometría de masas. La troponina I cardíaca nitrada también puede detectarse en tejido de corazón como resultado de biopsia, mediante técnicas de transferencia Western y por microscopía confocal.

50 Usando técnicas de inmunoenriquecimiento e inmunodetección fue posible determinar que la troponina I cardíaca se nitra después de la isquemia miocárdica. Además, es posible detectar dicha troponina I cardíaca nitrada en el suero de individuos después del evento isquémico. Así, los presentes inventores tienen el descubrimiento de un nuevo biomarcador para isquemia cardíaca.

Detección por espectrometría de masas

55 En algunas realizaciones, el biomarcador de la presente invención puede detectarse por espectrometría de masas.

60 La espectrometría de masas, acoplada o no a cromatografía de líquidos, es una técnica que puede distinguir y cuantificar proteínas monitorizando fragmentos de péptido específicos, su tiempo de retención y la relación entre ellos.

Esta técnica es capaz de diferenciar entre proteínas similares con diferentes modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, glucosilación, lipidación, metilación, cisteinación, acetilación, oxidación, nitración y sulfonación.

65

- El espectrómetro de masas puede acoplarse a uno o varios tipos de cromatografías de líquido que pueden ayudar en la detección de moléculas específicas o fragmentos de las mismas. La cromatografía de líquidos acoplada al espectrómetro de masas puede usar diversos tipos de técnicas de separación tales como hidrofobia, afinidad, intercambio iónico, inmunofinidad, entre otros.
- 5 En algunas realizaciones de la invención, se usa espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos para cuantificar las concentraciones de troponina I cardíaca nitrada en las muestras de individuos.
- 10 En algunas realizaciones, el espectrómetro de masas usado es TQ-ESI (electropulverización con cuadrupolo) acoplado a una columna de cromatografía de fase inversa PFP. En algunas realizaciones, la columna acoplada al espectrómetro de masas también puede ser una columna de inmunofinidad unida a anti-troponina I cardíaca nitrada. En algunas realizaciones, puede haber dos columnas acopladas. En algunas realizaciones de la invención, también pueden usarse otros tipos de columnas cromatográficas.
- 15 El espectrómetro de masas de TQ-ESI es un dispositivo capaz de monitorizar y cuantificar con alta sensibilidad y especificidad uno o más péptidos específicos y fragmentos de los mismos. En el primer cuadrupolo, se selecciona la región de masa / ión de carga que se desea monitorizar y el segundo cuadrupolo actúa de una cámara de colisión donde el ión seleccionado en el primer cuadrupolo se fragmenta en varios iones que se monitorizan y cuantifican en el tercer cuadrupolo.
- 20 En el TQ-ESI es posible monitorizar y cuantificar simultáneamente las concentraciones de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca total.
- 25 En una realización, la cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas de fase inversa con resina PFP proporciona la separación del péptido derivado de la troponina I cardíaca nitrada del péptido derivado de troponina I cardíaca no nitrada.
- 30 El grupo NO₂ presente en el péptido de tirosina de troponina I cardíaca nitrada tiene alta afinidad por PFP, y por tanto este péptido tiene un tiempo de elución de la columna más largo cuando se compara con el péptido de troponina I cardíaca no nitrada. En una realización de la invención, las concentraciones de troponina I cardíaca nitrada en muestras de individuos se monitoriza cuantificando el fragmento tríptico derivado de troponina I cardíaca nitrada AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2).
- 35 En algunas realizaciones de la invención, se monitorizan los iones mono-cargados e iones doblemente cargados de masa/carga específica (m/z) del péptido AY(NO₂)ATEPHAK. En esta realización, también se monitorizan los iones derivados de la fragmentación del péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) en la cámara de colisión. Los iones cuantificados derivados de la fragmentación de AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) son: carga única de Y(NO₂) con masa/carga específica; carga única de AY(NO₂) con masa/carga específica; carga única de AY(NO₂)A con masa/carga específica y carga única de AY(NO₂)ATE (SEQ ID NO:5) con masa/carga específica.
- 40 En algunas realizaciones, la relación de derivada de la fragmentación de AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) también se monitoriza. El mantenimiento de la relación de iones derivada de la fragmentación del péptido es una indicación de la especificidad de la prueba de diagnóstico. La relación de iones debe ser siempre constante.
- 45 En algunas realizaciones de la invención, con el fin de calcular la concentración de troponina I cardíaca nitrada en las muestras de individuos, los valores obtenidos se comparan con valores de una curva patrón de concentraciones conocidas. Las lecturas de los valores de la curva patrón se adquieren siempre en paralelo a las muestras.
- 50 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en las concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada purificada.
- En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en las concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada recombinante purificada.
- 55 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en las concentraciones conocidas de péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) sintético.
- 60 En algunas realizaciones de la invención, se usa un patrón interno para corregir el cálculo de la concentración de troponina I cardíaca nitrada en la muestra. En algunas realizaciones de la invención, el patrón interno es el péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) de concentración conocida marcado con ¹³C y ¹⁵N, insertado en cada muestra al principio del proceso. En algunas realizaciones de la invención, el patrón interno es troponina I cardíaca nitrada de concentración conocida marcada con ¹³C y ¹⁵N, insertada en cada muestra al principio del proceso.
- 65 En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada en la muestra se usará para el diagnóstico de síndrome agudo coronario.

- En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada en la muestra se usará para el pronóstico de síndrome agudo coronario.
- 5 En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada en la muestra se usará para determinar el tratamiento de pacientes con síndrome agudo coronario.
- En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada en la muestra se usará para monitorizar el tratamiento de pacientes con síndrome agudo coronario.
- 10 En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada es proporcional al área afectada por isquemia.
- En algunas realizaciones del método, la relación de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca se usa para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de pacientes con síndrome agudo coronario.
- 15 En algunas realizaciones, las concentraciones de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca total se determinan simultáneamente, seguido de calcular la relación de concentraciones. En algunas realizaciones, estas concentraciones se determinan por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos.
- 20 En esta realización, el espectrómetro de masas usado es TQ-ESI (electropulverización con cuadrupolo) acoplado a una columna de cromatografía de fase inversa PFP.
- En algunas realizaciones, la columna acoplada al espectrómetro de masas también puede ser una columna de inmunoafinidad unida a anti-troponina I cardíaca nitrada. En algunas realizaciones, puede haber dos columnas acopladas. En algunas realizaciones del método, también pueden usarse otros tipos de columnas cromatográficas.
- 25 En una realización de la invención, se realiza la monitorización de las concentraciones de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca total presentes en las muestras de sujetos. En esta realización, se monitorizan y cuantifican las concentraciones de fragmentos AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) derivados de troponina I cardíaca nitrada, y el fragmento AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) derivados de troponina I cardíaca.
- 30 En algunas realizaciones de la invención, se realiza la monitorización de iones mono y doblemente cargados de masa / carga específica obtenidos del péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) y AYATEPHAK (SEQ ID NO:3).
- 35 En algunas realizaciones de la invención, a partir del péptido AY(NO₂) ATEPHAK (SEQ ID NO:2) se hace la monitorización de iones mono-cargados de m/z específica e iones doblemente cargados de m/z específica. En una realización de la invención en cuestión, también se monitorizan los iones derivados de la fragmentación del péptido en la cámara de colisión. Los iones derivados de la fragmentación de AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) cuantificados son: carga única de Y(NO₂) con masa/carga específica; carga única de AY(NO₂) con masa/carga específica; carga única de AY(NO₂)A con masa/carga específica y carga única de AY(NO₂)ATE (SEQ ID NO:5) con masa/carga específica. Los iones derivados de la fragmentación de AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) cuantificados son: carga única de ATEPHAK (SEQ ID NO:3) con masa/carga específica; carga única de PHAK (SEQ ID NO:6) con masa/carga específica; carga única de HAK con masa/carga específica y AK carga única con masa/carga específica.
- 40 En algunas realizaciones, la monitorización de la relación de iones se hace a partir de iones derivados de la fragmentación de AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) y la fragmentación de AYATEPHAK (SEQ ID NO:3). El mantenimiento de la relación de iones derivada de la fragmentación de los péptidos es un indicativo de la especificidad de la prueba de diagnóstico. La relación de iones debe ser constante.
- 45 En algunas realizaciones de la invención, para calcular la concentración de troponina I cardíaca nitrada en las muestras de sujetos, los valores se comparan con valores de una curva patrón de concentraciones conocidas. Las lecturas de los valores de la curva patrón siempre se adquieren en paralelo a las muestras.
- 50 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en las concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada recombinante y troponina I cardíaca no nitrada recombinante.
- 55 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en las concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada purificada y troponina cardíaca no nitrada purificada.
- 60 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en las concentraciones conocidas de péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) sintético y péptido AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) sintético.
- 65 En algunas realizaciones de la invención, se usa un patrón interno para corregir el cálculo de la concentración de troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca no nitrada en la muestra. En algunas realizaciones de la invención, el patrón interno es el péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) y el péptido AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) de concentración conocida marcados con ¹³C y ¹⁵N, insertados en cada muestra al principio del proceso.

En algunas realizaciones de la invención, el patrón interno es troponina I cardíaca nitrada con respecto a troponina I cardíaca no nitrada de concentraciones conocidas marcados con ¹³C y ¹⁵N, insertados en cada uno muestra al principio del proceso.

5 En algunas realizaciones de la invención, la relación de la concentración troponina I cardíaca nitrada y troponina I cardíaca no nitrada se usará para el diagnóstico de síndrome agudo coronario.

En algunas realizaciones de la invención, la relación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada con respecto a troponina cardíaca no nitrada se usará para el pronóstico de síndrome agudo coronario.

10 En algunas realizaciones de la invención, la relación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada con respecto a troponina cardíaca no nitrada se usará para definir el tratamiento de pacientes con síndrome agudo coronario.

15 En algunas realizaciones de la invención, la relación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada con respecto a troponina cardíaca no nitrada se usará para monitorizar el tratamiento de pacientes con síndrome agudo coronario.

20 En algunas realizaciones de la invención, la relación de la concentración de troponina I cardíaca nitrada con respecto a troponina cardíaca no nitrada es proporcional al área afectada por isquemia.

En algunas realizaciones de la invención, las muestras usadas pueden ser plasma o suero.

25 En algunas realizaciones de la invención, hay un primer fraccionamiento de las proteínas presentes en las muestras por cromatografía. En algunas realizaciones de la invención, la cromatografía usada es fase inversa. En algunas realizaciones de la invención, la cromatografía usada es una cromatografía de inmunoafinidad con anti-troponina I cardíaca nitrada monoclonal unida a la columna. En algunas realizaciones de la invención se usan dos cromatografías secuenciales. En algunas realizaciones de la invención también pueden usarse otros tipos de columnas de cromatografía.

30 En algunas realizaciones de la invención, las proteínas se digieren por tripsina después del fraccionamiento por cromatografía. En algunas realizaciones de la invención, las proteínas se digieren antes del proceso cromatográfico.

Anticuerpo anti-troponina I cardíaca nitrada

35 La invención proporciona un anticuerpo específico para troponina I cardíaca nitrada. Este anticuerpo es específico para troponina I cardíaca nitrada y no muestra afinidad por troponina I cardíaca no nitrada o cualquier otra forma de modificaciones post-traduccionales de la troponina I cardíaca distinta de nitración. El anticuerpo no reconoce otras isoformas de troponinas ni post-traduccionales modificadas. El anticuerpo no reconoce otras isoformas de troponina post-traduccionales modificadas. El anticuerpo tampoco reconoce o detecta otras proteínas nitradas distintas de la troponina I cardíaca. El anticuerpo no reacciona de forma cruzada con troponina esquelética.

40 La anti-troponina I cardíaca nitrada es un anticuerpo específico para una región que comprende los aminoácidos 16-35 de la troponina I cardíaca nitrada. Este anticuerpo reconoce la región que comprende la nitración de tirosina, la nitración. El anticuerpo se desarrolló a partir del péptido PAPIRRRSSNY(NO₂) RAY(NO₂)ATEPHA (SEQ ID NO:3).

45 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo reconoce troponina I cardíaca nitrada completa. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo reconoce un péptido de troponina I cardíaca nitrada AY(NO₂)ATHEPHA (SEQ ID NO:2).

50 El anticuerpo reconoce troponina I cardíaca nitrada en seres humanos, cerdos, ratas y ratones. Y debido a la homología de la proteína, probablemente reconoce la troponina I cardíaca nitrada en perro, gato, caballo, orangután, chimpancé y posiblemente otros animales.

55 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-troponina I cardíaca policlonal producida en cabra de HyTest. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-nitrotirosina policlonal producida en conejo de Millipore. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-conejo monoclonal producido en ratón marcado con HRP. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-cabra producido en ratón marcado con HRP.

60 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-conejo producido en ratón marcado con Alexa 488. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-conejo producido en ratón marcado con Alexa 555. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo usado es anti-cabra producido en ratón marcado con Alexa-488. En algunas realizaciones de la invención el anticuerpo usado es anti-cabra producido en ratón marcado con Alexa-555.

65

Detección de inmunoensayo

- 5 Las técnicas de inmunoensayo se basan en la unión antígeno-anticuerpo, así la detección de la molécula diana se hace usando anticuerpos específicos. Las técnicas de inmunoensayo se caracterizan por generar resultados rápidos, sensibles, económicos y cuantitativos.
- Las técnicas de inmunoensayo pueden ser enzimáticas tales como ELISA y transferencia Western, fluorescentes tal como inmunofluorescencia y citometría de flujo o isotópicas tales como radioinmunoensayo.
- 10 En algunas realizaciones de la invención, la troponina I cardíaca nitrada puede detectarse y cuantificarse por inmunoensayo. Para el desarrollo de pruebas de inmunoensayo, los presentes inventores desarrollaron un anticuerpo monoclonal producido en ratón específico para troponina I cardíaca nitrada.
- 15 En algunas realizaciones de la invención, el inmunoensayo usado fue ELISA de sándwich con IgG monoclonal anti-troponina I cardíaca nitrada y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcada con enzima.
- En algunas realizaciones de la invención, el inmunoensayo usado fue ELISA por competición, usando el anticuerpo monoclonal IgG anti-troponina I cardíaca nitrada y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcada con enzima. En esta realización del método se usó el péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) como competidor. En algunas realizaciones de la invención, el péptido competitivo es sintético.
- 20 En algunas realizaciones de la invención, con el fin de calcular la concentración de troponina I cardíaca nitrada en las muestras de sujetos, los valores se comparan con valores de una curva patrón de concentraciones conocidas. Las lecturas de los valores de la curva patrón se adquieren siempre en paralelo a las muestras.
- 25 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en concentraciones crecientes conocidas de troponina I cardíaca nitrada recombinante.
- En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en concentraciones crecientes conocidas de troponina I cardíaca nitrada purificada.
- 30 En algunas realizaciones de la invención, una curva patrón consiste en concentraciones crecientes conocidas del péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) sintético.
- 35 En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada se usará para el diagnóstico de síndrome agudo coronario.
- En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada se usará para el pronóstico de síndrome agudo coronario.
- 40 En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada se usará para definir el tratamiento para pacientes con síndrome agudo coronario.
- 45 En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada se usará para monitorizar el tratamiento de pacientes con síndrome agudo coronario.
- En algunas realizaciones de la invención, el valor de concentración de troponina I cardíaca nitrada es proporcional al área afectada por isquemia.
- 50 La troponina I cardíaca nitrada se caracterizó por detección de fragmentos de péptidos por espectrometría de masas ESI-TQ acoplada a cromatografía de líquidos. Estas características proporcionan un método de determinación de la presencia y concentración de moléculas en muestras biológicas.
- 55 La troponina I cardíaca nitrada también se caracterizó por inmunoensayo con anticuerpo monoclonal específico para troponina I cardíaca nitrada. Este método también se usa para determinar las concentraciones de muestras nitradas de troponina I cardíaca de individuos.
- Este biomarcador se descubrió por inmunoprecipitación de todas las proteínas nitradas presentes en el suero, seguido de detección de troponina I cardíaca nitrada por transferencia Western.
- 60 El descubrimiento del biomarcador usó primero cerdos como modelos. Los presentes inventores realizaron isquemia miocárdica inducida por oclusión de catéter con globo durante 10 minutos seguido de reperfusión o no.
- 65 Se recogieron muestras de suero de estos animales inmediatamente antes de la oclusión, inmediatamente después de la reperfusión y a intervalos de 30 minutos después de la aparición de la reperfusión durante hasta 3 horas.

Se incubaron muestras de suero con perlas unidas a proteína A (DynaBeads de Invitrogen) acopladas a anticuerpos policlonales producidos en anti-nitrotirosina de conejo (Millipore).

Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron de anticuerpos y se aplicaron en gel al 12 % de SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de PVDF (GE) y se incubaron con anticuerpo monoclonal de detección producido en ratón anti-troponina I cardíaca nitrada o anticuerpo policlonal producido en anti-troponina I cardíaca de cabra. Controles de muestras de suero, es decir, antes de la inducción de isquemia, hay detección de troponina I cardíaca nitrada. Se recogieron muestras de suero después de la inducción de isquemia para la detección de troponina I cardíaca nitrada. Este método se describe en más detalle en la sección de Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de troponina I cardíaca nitrada como biomarcador para isquemia miocárdica y enfermedad aguda coronaria

Con el fin de identificar troponina I cardíaca nitrada, se realizó un enriquecimiento de proteínas del suero nitradas seguido de la identificación de troponina I cardíaca por transferencia Western.

El enriquecimiento de proteínas del suero nitradas se realizó por inmunoprecipitación según un protocolo modificado como se describe por Parastatidis, 2007.

Se lavaron tres veces perlas magnéticas de proteína A (DynaBeads de Invitrogen) con PBS y luego se incubaron con anticuerpo anti-nitrotirosina (Millipore) a una relación de 1 µg de anticuerpo por cada 5 µl de perlas magnéticas de proteína A. El anticuerpo se diluyó en PBS en el mismo volumen final usado para las perlas magnéticas de proteína A. Las perlas y los anticuerpos se agitaron a 4 °C durante 16 horas. Después de la incubación, el sobrenadante se desechó y el complejo perla-anticuerpo se lavó con 0,1 % de PBST tres veces con agitación durante cinco minutos. Para realizar el enlace covalente entre el anticuerpo y la proteína A acoplada a la perla, el complejo se incubó con 6,5 mg/ml de DMP diluido en trietanolamina 200 mM durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente.

Este proceso se repitió tres veces, intercalado con un lavado con trietanolamina 200 mM con agitación durante cinco minutos entre incubaciones con DMP. Después del enlace, la extinción se realizó con dos incubaciones de cinco minutos con etanolamina 50 mM. Para eliminar los anticuerpos que no están covalentemente unidos, el complejo perla-anticuerpo se incubó dos veces durante 10 minutos a pH 2,5 con glicina 1 M.

El complejo perla-anticuerpo se almacenó a 4 °C en PBS con azida de sodio 2 mM.

Para la identificación de troponina I cardíaca nitrada, se usó suero y tejido del corazón de isquemia miocárdica de modelo animal.

La proteína total se midió por el método de Bradford (BioRad). Se separaron 10 mg de proteína y se pre-incubaron con 50 µl de perlas magnéticas acopladas a proteína A (DynaBeads de Invitrogen) con agitación a 4 °C durante 16 horas. Entonces, el sobrenadante se extrajo y se incubó con 50 µl de perlas magnéticas de proteína A unidas covalentemente a los anticuerpos con agitación a 4 °C durante 16 horas. Después de la incubación, el sobrenadante se desechó y las perlas se lavaron tres veces con PBST al 0,1 %. Las proteínas nitradas se eluyeron con tres lavados consecutivos de 100 ml de glicina 0,1 M a pH 2,5. El pH de la solución que contenía la proteína se nitro equilibrado con 25 µl de Tris-HCl 1 M a pH 9,0. Entonces se secaron por Speed-vac. Para confirmar el enriquecimiento de proteínas del suero nitradas, se cargó proteína inmunoprecipitada sobre 12 % de SDS-PAGE, seguido de tinción con plata (Sigma) (Figura 1).

Los inmunoprecipitados de proteína se cuantificaron usando un espectrofotómetro ND-1000 nanodrop (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 280 nm. Se usó una curva patrón de BSA nitrada para calcular las concentraciones de proteína.

Se realizó una electroforesis en gel al 15 % de SDS-PAGE usando 5 µg de inmunoprecipitados en 15 % de SDS-PAGE nitrados. Se insertaron muestras de proteína en carriles paralelos en el gel junto con un marcador de peso molecular (Kaleidoscope BioRad). Después de la migración de las proteínas en el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (GE HybondP) en la semi-seca durante 50 minutos. Después de la transferencia, la membrana continuó durante 16 horas a 37 °C para el secado perfecto. Al día siguiente, la membrana se bloqueó durante 1 hora con 5 % de leche en polvo diluida en 0,1 % de PBST. Después de 3 lavados con 0,1 % de PBST, la membrana se incubó durante 16 horas a 4 °C con agitación con un anticuerpo de cabra policlonal anti-troponina I cardíaca (comercialmente obtenido de Hytest N.º 4T21) diluido en 5 % de leche en polvo diluida en PBST al 0,1 %. Después de lavar, la membrana se incubó durante 1 hora con anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra conjugado con HRP, se lavó otra vez y se reveló por el método de ECL.

Usando técnicas de inmunoenriquecimiento e inmunodetección fue posible determinar que la troponina I cardíaca se nitró después de la isquemia miocárdica. Además, es posible detectar dicha troponina I cardíaca nitrada en el suero de individuos después del evento isquémico. Por consiguiente, la troponina I cardíaca nitrada puede usarse como biomarcador para isquemia cardíaca.

5

Ejemplo 2

Identificación de troponina I cardíaca nitrada en modelos porcinos de isquemia controlada

Tres cerdos se sometieron a isquemia controlada en la arteria coronaria circunfleja izquierda proximal por una oclusión durante 10 minutos usando un catéter con globo, seguido de 3 horas de reperfusión (Figura 3). Se recogieron muestras de suero de 5 ml antes de la intervención, inmediatamente después de la intervención y 10, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la reperfusión con el fin de analizar las concentraciones de CK-MB, troponina I y troponina T ultra-sensible. Estas proteínas son marcadores de necrosis de tejido, que se produce con una oclusión de más de 30 minutos y estarían circulando después de aproximadamente 6 horas del evento isquémico con la aparición de necrosis.

Como era de esperar, no se observó aumento de CK-MB, troponina T y troponina T ultra-sensible en el suero de los animales, excepto un animal durante el último punto de recogida que era responsable de un aumento en los valores medios observados (Figura 4).

El enriquecimiento de la porción nitrada de muestras biológicas se realizó por inmunoprecipitación. Se unieron covalentemente las perlas magnéticas de proteína A a anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (relación 1:5). Posteriormente, el complejo se incubó con 10 mg de suero o proteínas plasmáticas de. Se lavó el complejo y las proteínas unidas al anticuerpo se eluyeron con ácido acético 800 mM. Entonces, se cuantificó la muestra y se aplicaron 5 µg de proteína a electroforesis en 12 % de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membrana y se incubaron con una anti-troponina I cardíaca policlonal y se revelaron por ECL (Figura 5).

Los resultados demostraron que antes de la inducción de isquemia no pudo observarse la presencia de troponina I cardíaca nitrada en el suero del animal. La proteína pudo identificarse inmediatamente después de la isquemia y siguió en la circulación sanguínea durante hasta 3 horas después de la inducción de isquemia.

Ejemplo 3

Identificación de troponina I cardíaca nitrada en modelos porcinos de infarto agudo de miocardio.

Cinco cerdos se sometieron a una oclusión permanente de la arteria coronaria circunfleja usando un injerto de poliestireno. Se recogieron muestras de suero de 5 ml antes de la intervención, inmediatamente después de la intervención y 10, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la reperfusión con el fin de analizar las concentraciones de CK-MB, troponina I y troponina T ultra-sensible. Estas proteínas son marcadores de necrosis de tejido, que se produce con una oclusión de más de 30 minutos y estarían circulando después de aproximadamente 6 horas del evento isquémico con la aparición de necrosis. Como era de esperar, la troponina T aumentó después de 6 horas de la aparición del infarto agudo de miocardio. La troponina T ultra-sensible aumentó poco después de la aparición de isquemia sin reperfusión.

Se unieron covalentemente perlas magnéticas de proteína A a anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (relación 1:5). Posteriormente, el complejo se incubó con 10 mg de suero o proteínas plasmáticas de. Se lavó el complejo y las proteínas unida al anticuerpo se eluyeron con ácido acético 800 mM. Entonces, se cuantificó la muestra y se aplicaron 5 µg de proteína a electroforesis en 12 % de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membrana y se incubaron con una anti-troponina I cardíaca policlonal y se revelaron por ECL (Figura 6).

Los resultados demuestran que en situaciones donde no hay reperfusión, la troponina I cardíaca nitrada se detecta en el suero después de aproximadamente 180 minutos de la aparición del infarto agudo de miocardio.

Ejemplo 4

Identificación de troponina I cardíaca nitrada en pacientes después de angioplastia con terapia farmacológica de prótesis endovascular

Pacientes con angina estable que se sometieron a angioplastia con implantación de prótesis endovascular convencional, "Hospital das Clínicas - Instituto do Coração" de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo se enrolaron en este estudio prospectivo de marcadores de isquemia. El protocolo fue enviado para autorización por el Comité de ética en la investigación del "Hospital das Clínicas" - Universidad de Sao Paulo. Fueron aptos cinco pacientes con angina estable y una indicación de angioplastia con implantación de prótesis endovascular para el estudio. Estos pacientes tenían isquemia documentada en monitorización electrocardiográfica continua durante el procedimiento angiográfico: elevación breve y transitoria del segmento ST. Se recogieron muestras de

suero antes del procedimiento, inmediatamente después y cada 30 minutos hasta que se completaron las 3 horas de isquemia inducida.

5 Se dosificaron troponina I ultra-sensible y troponina T en el suero de paciente, como era de esperar no hubo aumento en estos marcadores (Figura 7).

10 Se unieron covalentemente perlas magnéticas de proteína A a anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (Millipore) y el complejo se incubó con 10 mg de proteínas de suero o plasma. El complejo se lavó y las proteínas unidas se eluyeron con ácido acético 800 mM. Posteriormente, la muestra se cuantificó y se aplicaron 5 µg de muestra de proteína a un gel de electroforesis en 12 % de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana y se incubaron con una anti-troponina I cardíaca policlonal y se revelaron por el método de ECL (Figura 8).

Ejemplo 5

15 Identificación de troponina I cardíaca nitrada en un modelo celular de isquemia cardíaca *in vitro*

Se realizaron reacciones de inmunofluorescencia en cardiomiocitos después de la isquemia *in vitro* con el fin de verificar la posible co-localización de las marcas de los anticuerpos anti-troponina I cardíaca y anti-nitrotirosina.

20 Se desarrolló isquemia *in vitro* poniendo cardiomiocitos cultivados bajo tensión de oxígeno baja, glucosa baja y pH ácido. Se hizo una curva de tiempo a intervalos de 15, 30 y 60 minutos de isquemia, seguido de 60 minutos de perfusión con tensión de oxígeno normal para determinar el mejor punto para la isquemia. Se eligieron sesenta minutos como punto experimental, cuando se obtuvo una tinción más fuerte del anticuerpo anti-nitrotirosina.

25 La marca para el anticuerpo anti-troponina I cardíaca se co-localizó con la marca para el anticuerpo anti-nitrotirosina (Figura 9). Las células que no experimentaron isquemia mostraron una marca débil de nitrotirosina en comparación con las células isquémicas. Los cultivos que experimentaron isquemia *in vitro* presentaron una co-localización más fuerte, sugiriendo que la troponina I cardíaca se nitra durante la isquemia.

30 Ejemplo 6

Identificación de troponina I cardíaca nitrada en el miocardio de modelo murino de isquemia cardíaca e infarto agudo de miocardio

35 Con el fin de reproducir la nitración de troponina I *in vitro*, los presentes inventores realizaron isquemia e infarto en ratas. Se congelaron los corazones de tres ratas en cada grupo (control, 10 minutos de isquemia e infarto). Se prepararon portaobjetos histológicos nuevos y se realizó ensayo de inmunofluorescencia posterior con anticuerpos anti-troponina I y anti-nitrotirosina. Los datos reproducen los resultados encontrados en la isquemia *in vitro*, que muestran que la nitración de troponina I cardíaca también se produce *in vivo* (Figura 10).

40 Los datos sugieren que cuanto mayor sea el tiempo de tensión de oxígeno baja en el músculo cardíaco, mayor será la cantidad de troponina I nitrada.

45 Ejemplo 7

Caracterización molecular de troponina I cardíaca nitrada

50 Con el fin de caracterizar y describir la nitración de troponina I cardíaca, se nitró una troponina I cardíaca humana purificada *in vitro* y se analizó por espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía de líquidos.

Para el ensayo de nitración *in vitro*, los presentes inventores usaron troponina I cardíaca humana (Sigma N.º T9924). Se sintetizó peroxinitrito y posteriormente se nitraron 40 µg de troponina I cardíaca con peroxinitrito 1 mM.

55 La proteína nitrada se digirió con tripsina durante 16 horas a 37 °C y los péptidos se analizaron en un LC-ESI-Q-TOF (Synapt II - Waters). El análisis de espectrometría de masas permitió la identificación y caracterización del péptido nitrado y el sitio de nitración (tirosina 29). El análisis cubre el 66,7 % de la proteína, que incluye el sitio de nitración.

La secuencia de la troponina I cardíaca nitrada es (SEQ ID NO:1):

MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNY(NO₂)RAY(NO₂)ATEPHA
 KKKSKISASRKLQLKTLKLLQIAKQELEREAEEERRGKGRALSTRCQPLELAG
 LGFAELQDLRQLHARVDKVDEERYDIEAKVTKNITEIADLTQKIFDLRGKFK
 RPTLRRVRISADAMMQALLGARAKESLDLRAHLKQVKKEDTEKENREVGD
 WRKNIDALSGMEGRKKKFESL

La nitración puede producirse en una o dos tirosinas. Los mismos resultados se obtuvieron para troponina purificada de muestras humanas.

5

Ejemplo 8

Análisis de troponina I cardíaca nitrada en muestras humanas por LC-ESI-TQS

10 Para la identificación y cuantificación de troponina I cardíaca nitrada en muestras de paciente se usó un espectrómetro de masas LC-ESI-TQS (Xevo TQ-S-Waters). La prueba se optimizó usando los péptidos AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) derivado de troponina I cardíaca nitrada y AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) derivado de troponina I cardíaca no nitrada.

15 Los péptidos se sintetizaron a una pureza superior al 90 %, se nitraron con 2 mM de peroxinitrito y luego se purificaron por HPLC.

El espectrómetro de masas se acopló a una columna de cromatografía tipo PFP, que permitió una unión y elución diferencial de los péptidos de troponina I cardíaca nitrada y no nitrada.

20

La monitorización de iones mono y doblemente cargados específicos de m/z se realizó usando el péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2). También se monitorizaron los iones derivados de la fragmentación del péptido en la cámara de colisión.

25 Los iones cuantificados derivados de la fragmentación de AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) son: carga única de Y(NO₂) con masa/carga específica; carga única de AY(NO₂) con masa/carga específica; carga única de AY(NO₂)A con masa/carga específica y carga única de AY(NO₂)ATE (SEQ ID NO:5) con masa/carga específica.

30 Los iones cuantificados derivados de la fragmentación de AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) son: carga única de ATEPHAK (SEQ ID NO:7) con masa/carga específica; carga única de PHAK (SEQ ID NO:6) con masa/carga específica; carga única de HAK con masa/carga específica y carga única de AK con masa/carga específica.

Después de la normalización de parámetros, la troponina I cardíaca nitrada pudo identificarse y cuantificarse en suero, plasma, proteínas, proteína inmunoprecipitada y proteína de tejido. Se tomaron en alícuotas 50 µl de muestra (suero, proteína inmunoprecipitada o tejido) con 10 µl de solución de NH₄HCO₃. Se añadieron 25 µl de 0,2 % de RapiGest SF (Waters). La solución se sometió a vórtex y se incubó durante 15 minutos a 80 °C. Después de la incubación, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 2,5 ml de DTT 100 mM. La solución se incubó durante 30 min a 60 °C y se añadieron 2,5 ml de yodoacetoamida 300 mM. La reacción se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de la alquilación, se añadieron 10 µl de 0,05 g/ul de tripsina (Promega) diluidos en NH₄HCO₃ 50 mM. La solución se sometió a vórtex y se incubó durante 16 horas a 37 °C.

Después de la digestión con tripsina para hidrolizar RapiGest, se añadieron 10 µl de 5 % de TFA (Pierce) a la solución que se incubó durante 90 min a 37 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 6 °C.

Las muestras se analizaron en el espectrómetro usando una curva para concentraciones de troponina I cardíaca nitrada en paralelo. Se usó un patrón interno para corregir el cálculo de la concentración de troponina I cardíaca nitrada y no nitrada en la muestra. Los patrones internos son el péptido AY(NO₂)ATEPHAK (SEQ ID NO:2) y el péptido AYATEPHAK (SEQ ID NO:3) de concentración conocida marcados con ¹³C y ¹⁵N e insertados en cada muestra al principio del proceso.

Ejemplo 9

55 Anticuerpo anti-troponina I cardíaca nitrada

Basándose en el análisis de la secuencia y la estructura de los péptidos de troponina I cardíaca nitrada, se eligió el péptido PAPIRRRSSNY(NO₂)RAY(NO₂)ATEPHA (SEQ ID NO:4). Este péptido se eligió debido a que presenta dos sitios de nitración de tirosina. Este péptido también se expone en la estructura 3D de la troponina I cardíaca nitrada. Este péptido se corresponde con la región que comprende los aminoácidos 16-35 de troponina I cardíaca nitrada.

5 a) Síntesis de péptidos.

Se sintetizaron 15 mg del péptido PAPIRRRSSNY(NO₂)RAY(NO₂)ATEPHA (SEQ ID NO:4) a > 90 % de pureza. El péptido se nitró con 2 mM de peroxinitrito, seguido de purificación por HPLC en columna C18. El péptido nitrado purificado se usó en los ensayos de conjugación e inmunización.

b) Inmunización y cribado por ELISA.

15 El péptido modificado se conjugó con una proteína transportadora, tal como KLH o BSA. Se inmunizan 10 ratones Balb/c y se refuerzan con un protocolo de inmunización estándar. Se cribaron los sangrados de la cola por ELISA con péptidos nitrados y no nitrados, y BSA nitrada.

c) Fusión y cribado.

20 Se realizaron dos fusiones (1-2 bazos por fusión) en los ratones que mejor respondieron al nitro-péptido en la fase b). Las células de hibridoma se expandieron y se cribaron por ELISA con nitro y no nitro péptidos, y BSA nitrada. Todos los clones positivos se expandieron en placas de 24 pocillos. Los clones con los mejores valores de ELISA y especificidad por péptido nitrado se seleccionaron para subclonación.

25 d) Subclonación, expansión y criopreservación.

Se cribaron subclones de hibridoma por ELISA con péptido nitrado y no nitrado. Se subclonaron hasta cinco clones parentales positivos por dilución limitante, isotipificando los sobrenadantes positivos finales. Se expandieron y criopreservaron dos subclones para cada clon parental.

30 Referencias

- Abello N, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res.* 2009 Jul;8(7):3222-38.
- Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Beisswenger PJ, Thornalley PJ. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2005 Aug; 48(8):1590-603.
- Aslan M, Dogan S. Proteomic detection of nitroproteins as potential biomarkers for cardiovascular disease. *J Proteomics.* 2011 May 27.
- 40 Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJ. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics.* 1996 Jul 1;35(1):11-23.
- Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* 2003 Jun;85(6):1394-401.
- Choi DY, Zhang J, Bing G. Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging.* 2010 Sep;31(9):1649-53.
- 45 Debashis R et al. Ischemia-Modified Albumin Concentrations in Patients with Peripheral Vascular Disease and Exercise-Induced Skeletal Muscle Ischemia. *Clinical Chemistry* 50, No. 9, 2004
- Eggers KM, Jaffe AS, Lind L, Venge P, Lindahl B. Value of cardiac troponin I cutoff concentrations below the 99th percentile for clinical decision-making. *Clin Chem.* 2009 Jan;55(1):85-92.
- 50 Gole MD, Souza JM, Choi I, Hertkorn C, Malcolm S, Foust RF, 3rd, et al. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 May;278(5): L961-7.
- Heffron SP, Parastatidis I, Cuchel M, Wolfe ML, Tadesse MG, Mohler ER, 3rd, et al. Inflammation induces fibrinogen nitration in experimental human endotoxemia. *Free Radic Biol Med.* 2009 Oct 15;47(8):1140-6.
- Hochholzer W, Reichlin T, Twerenbold R, Stelzig C, Hochholzer K, Meissner J, et al. Incremental Value of High-Sensitivity Cardiac Troponin T for Risk Prediction in Patients with Suspected Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem.* 2011 Jul 19.
- Isobe C, Abe T, Terayama Y. Remarkable increase in 3-nitrotyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with lacunar stroke. *Brain Res.* 2009 Dec 11;1305:132-6.
- Levrant S, Vannay-Bouchiche C, Pesse B, Pacher P, Feihl F, Waeber B, et al. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2006 Sep 15;41 (6):886-95.
- 60 Lippi, Giuseppe; Brocco, Giorgio; Salvagno, Gian Luca; Montagnana, Martina; Dima, Francesco; Guidi, Gian Cesare High-workload endurance training may increase serum ischemia-modified albumin concentrations. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine.* 43(7):741-744, July 2005.
- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2009 Jan 27;119(3):e21-181

Masson S, Latini R, Anand IS. An update on cardiac troponins as circulating biomarkers in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2010 Mar;7(1):15-21.

McCaig LF, Burt CW. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2002 Emergency Department summary. Advance data from Vital and Health Statistics. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 2004.

Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2007 Apr 3;115(13):e356-75.

Parastatidis I, Thomson L, Fries DM, Moore RE, Tohyama J, Fu X, et al. Increased protein nitration burden in the atherosclerotic lesions and plasma of apolipoprotein A-I deficient mice. *Circ Res.* 2007 Aug 17;101(4):368-76.

Parikh SV, de Lemos JA. Biomarkers in cardiovascular disease: integrating pathophysiology into clinical practice. *Am J Med Sci.* 2006 Oct;332(4):186-97

Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res.* 2007 Jul 15;75(2):291-302.

Piroddi M, Palmese A, Pilolli F, Amoresano A, Pucci P, Ronco C, et al. Plasma nitroproteome of kidney disease patients. *Amino Acids.* 2011 Feb;40(2):653-67.

Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, Woolard RH, Feldman JA, Beshansky JR, et al. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *N Engl J Med* 2000;342(16):1163-70

Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med.* 2009 Aug 27;361(9):858-67.

Singh V, Martinezclark P, Pascual M, Shaw ES, O'Neill WW. Cardiac biomarkers - the old and the new: a review. *Coron Artery Dis.* 2010 Jun;21(4):244-56.

Turko IV, Li L, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5;278(36):33972-7.

Tyther R, McDonagh B, Sheehan D. Proteomics in investigation of protein nitration in kidney disease: technical challenges and perspectives from the spontaneously hypertensive rat. *Mass Spectrom Rev.* 2011 Jan-Feb;30(1):121-41.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fleury S.A. Fundação zerbini

<120> TROPONINA I CARDÍACA NITRADA COMO BIOMARCADOR DE ISQUEMIA CARDÍACA

<130> Listado de secuencias

<140> PCT/BR2013/000202

<141> 11-06-2013

<150> US 13/493.488

<151> 11-06-2012

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Nitratación

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Nitratación

<400> 1

ES 2 611 908 T3

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

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Nitratación

15 <400> 2

Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys
 1 5

<210> 3

ES 2 611 908 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 3

Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys
1 5

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nitratación

15

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Nitratación

20

<400> 4

25

Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr
1 5 10 15

Glu Pro His Ala 20

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

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Nitratación

35

<400> 5

40

Ala Tyr Ala Thr Glu
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 6

Pro His Ala Lys
1

50

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

55

<400> 7

ES 2 611 908 T3

Ala Thr Glu Pro His Ala Lys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido nitrado seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1;
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2; y
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4.

2. Una proteína de unión seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 (a) una proteína que se une específicamente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1;
 (b) una proteína que se une específicamente a una región de (a) que comprende los aminoácidos 16-35 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1;
 15 (c) una proteína que se une específicamente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4,

en la que la proteína de unión es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monocatenario, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado,

20 3. Un método de prueba y detección de la presencia de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma en una muestra de un sujeto que comprende:

- 25 a) proporcionar una muestra de plasma o suero de un sujeto humano; y
 b) probar y detectar si la troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma que comprenden un resto de tirosina nitrada está presente en dicha muestra.

30 4. El método de la reivindicación 3, que es un método de diagnóstico o pronóstico de isquemia miocárdica y que comprende además medir y comparar una concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma en la muestra con una curva patrón de concentraciones conocidas de troponina I cardíaca nitrada purificada o fragmentos de troponina I cardíaca nitrada.

35 5. El método de la reivindicación 3, que es un método de diagnóstico o pronóstico de isquemia miocárdica en un sujeto y que comprende además:

- 40 c) medir y determinar una relación de troponina I cardíaca no nitrada o fragmentos de la misma con troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma que comprende un resto de tirosina nitrada presente en dicha muestra; y
 d) comparar dichas relaciones con valores de referencia con el fin de diagnosticar o pronosticar isquemia cardíaca.

45 6. El método de la reivindicación 3, que es un método de diagnóstico o pronóstico de síndrome agudo coronario en un sujeto y que comprende además medir y comparar una concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos que comprenden un resto de tirosina nitrada de la misma con valores de referencia obtenidos de pacientes con el fin de diagnosticar o pronosticar síndrome agudo coronario.

7. El método de la reivindicación 3, que es un método de diagnóstico o pronóstico de síndrome agudo coronario en un sujeto y que comprende además:

- 50 c) medir y determinar una relación de troponina I cardíaca no nitrada o fragmentos de la misma con respecto a troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma que comprende un resto de tirosina nitrada presente en dicha muestra; y
 d) comparar dicha relación con valores de referencia obtenidos de pacientes con el fin de diagnosticar o pronosticar síndrome agudo coronario.

55 8. El método de la reivindicación 3, que es un método de estratificación de un nivel de riesgo de infarto de miocardio en un sujeto con o sin síndrome agudo coronario, que comprende además comparar la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma con valores de referencia obtenidos de pacientes con el fin de determinar el nivel de riesgo de infarto de miocardio.

60 9. El método de la reivindicación 3, que comprende además medir y comparar la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma que comprende un resto de tirosina nitrada con valores de referencia obtenidos de pacientes con el fin de determinar el nivel de riesgo de muerte.

65 10. El método de la reivindicación 3, que es un método de estratificación del nivel de riesgo de infarto de miocardio en un sujeto con o sin síndrome agudo coronario, que comprende además comparar la concentración de troponina I

cardíaca nitrada o fragmentos de la misma con valores de referencia obtenidos de pacientes con el fin de determinar el nivel de riesgo de infarto de miocardio.

- 5 11. El método de la reivindicación 3, que es un método de determinación de la presencia de cardiotoxicidad en un sujeto con o sin síndrome agudo coronario, que comprende además comparar la concentración de troponina I cardíaca nitrada o fragmentos de la misma con los valores de referencia obtenidos de pacientes con el fin de determinar el nivel de riesgo de infarto de miocardio.
- 10 12. El método de la reivindicación 3, en el que la etapa de prueba y detección comprende usar una espectrometría de masas.
13. El método de la reivindicación 3, en el que la etapa de prueba y detección comprende digerir enzimáticamente proteínas, seguido de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas de cuadrupolo en tándem.
- 15 14. El método de la reivindicación 3, en el que la etapa de prueba y detección comprende cromatografía de líquidos seguida de digestión y análisis de cromatografía de líquidos-espectrometría de cuadrupolo en tándem (LC-TQS).
15. El método de la reivindicación 12, en el que:
- 20 se monitoriza un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2;
se monitoriza un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:3; o
se monitorizan un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:3.
- 25 16. El método de la reivindicación 15, en el que los iones derivados de la fragmentación del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) son AY(NO₂), Y(NO₂), AY(NO₂)A y AY(NO₂)ATE mostrados en SEQ ID NO:5 y en el que los iones derivados de la fragmentación del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 son ATEPHAK como se muestra en SEQ ID NO:7, PHAK como se muestra en SEQ ID NO:6, HAK y AK.
- 30 17. El método de la reivindicación 3, en el que la etapa de prueba y detección comprende:
- realizar un inmunoensayo;
realizar un inmunoensayo que comprende un anticuerpo específico para troponina I cardíaca nitrada y/o troponina I cardíaca o fragmentos de la misma;
- 35 capturar uno o más de troponina I cardíaca nitrada, troponina cardíaca nitrada, y fragmentos de las mismas;
capturar uno o más de troponina I cardíaca nitrada, troponina cardíaca, y fragmentos de las mismas, que comprende un resto de tirosina nitrada con perlas paramagnéticas, un anticuerpo, o una columna de cromatografía;
- 40 capturar uno o más de troponina I cardíaca nitrada, troponina cardíaca, y fragmentos de las mismas, que comprende un resto de tirosina nitrada con un anticuerpo monoclonal específico para una región que comprende los aminoácidos 16-35 de SEQ ID NO:1 o un anticuerpo monoclonal específico para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4;
- 45 comparar (x) los valores obtenidos con (y) una curva patrón de concentraciones de troponina I cardíaca nitrada purificada y/o troponina I cardíaca o fragmentos de las mismas que comprenden un resto de tirosina nitrada o (z) un patrón interno; o
comparar (x) los valores obtenidos con (y) un patrón interno marcado con ¹³C y ¹⁵N y seleccionado del grupo que consiste en troponina cardíaca nitrada, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, troponina I cardíaca, y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.
- 50 18. El método de la reivindicación 3, en el que el sujeto tiene o se sospecha que tiene isquemia cardíaca, isquemia cardíaca aguda, isquemia cardíaca crónica, enfermedad crónica coronaria, síndrome agudo coronario, angina inestable, infarto de miocardio sin elevación del segmento ST o infarto de miocardio con elevación del segmento ST.
- 55 19. Un kit para diagnosticar isquemia cardíaca, que comprende el péptido aislado de la reivindicación 1 y un sistema para detectar el péptido unido a un anticuerpo para dicho péptido y/o un sustrato.

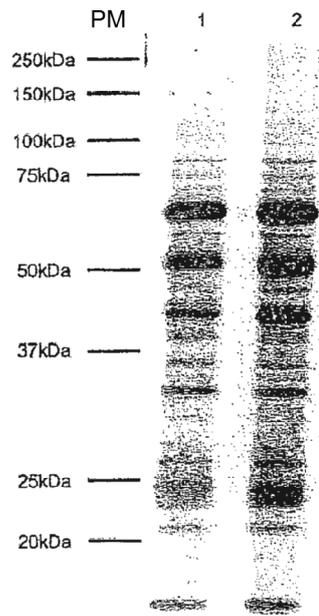


FIG. 1

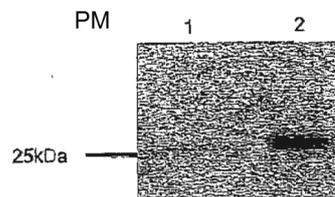


FIG. 2

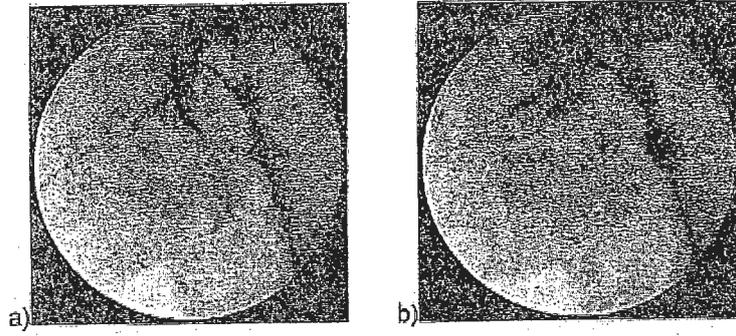
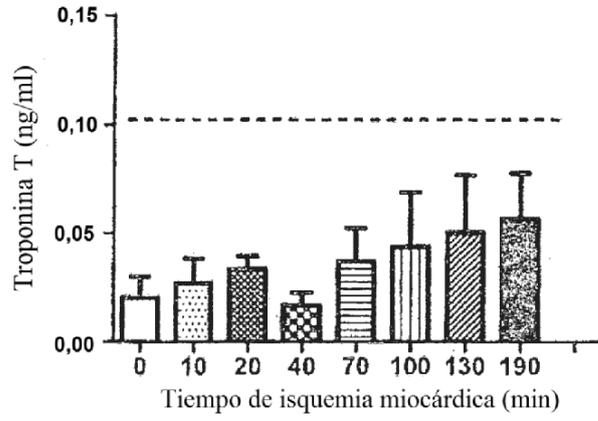
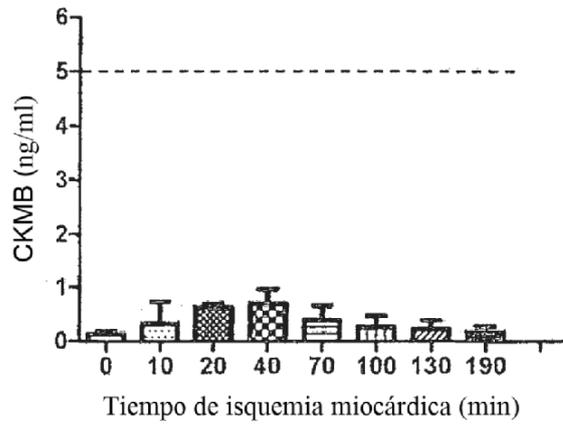


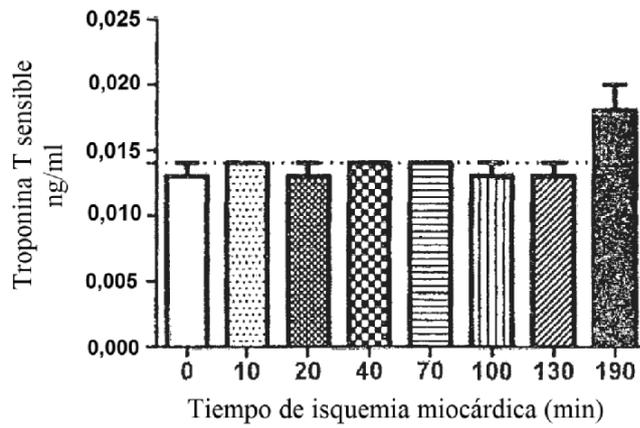
FIG. 3



A



B



C

FIG. 4

TIEMPO (MIN) DESPUÉS DEL COMIENZO DEL COMIENZO DE LA REPERFUSIÓN

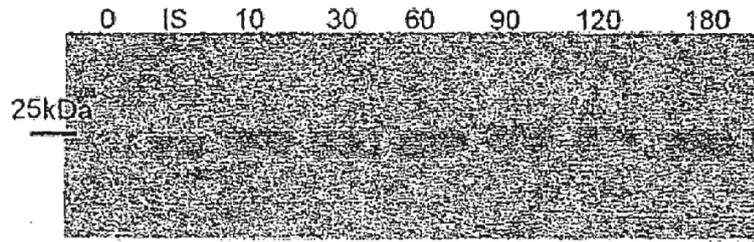


FIG. 5

TIEMPO DESPUÉS DEL INFARTO DE MIOCARDIO AGUDO (MINUTOS)

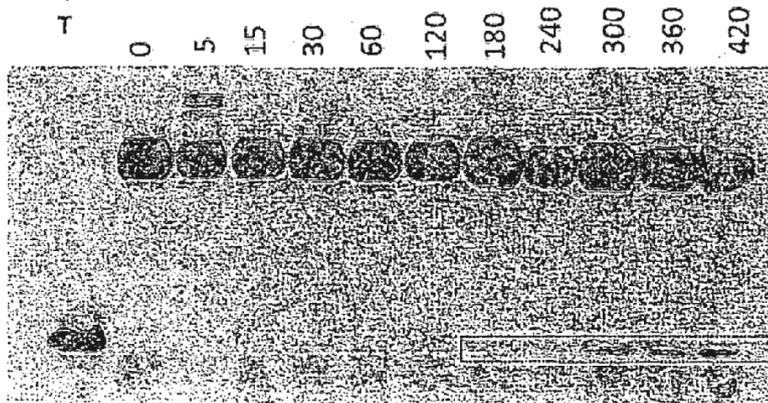
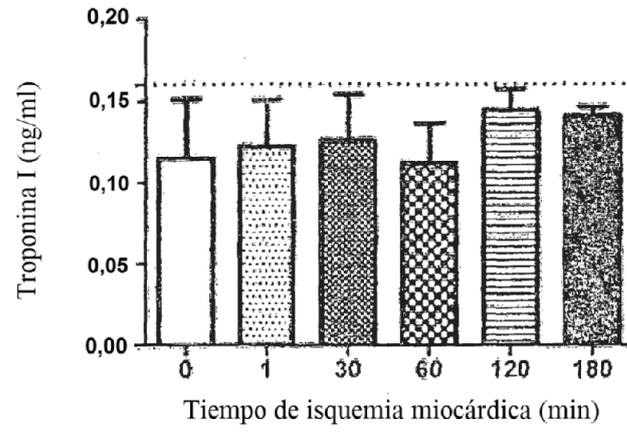
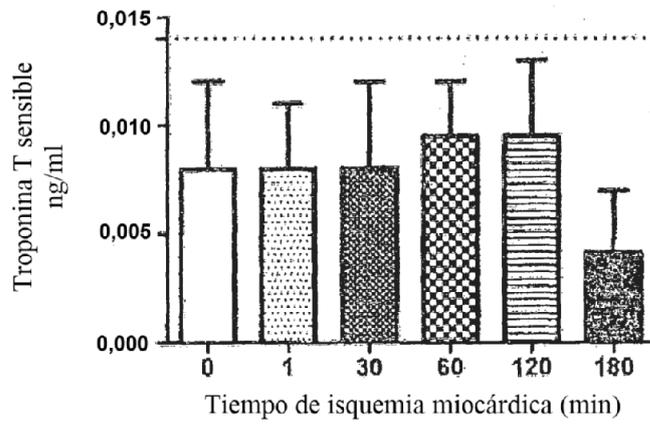


FIG.6 .



A



B

FIG. 7

TIEMPO (MIN) DESPUÉS DE LA ISQUEMIA INDUCIDA

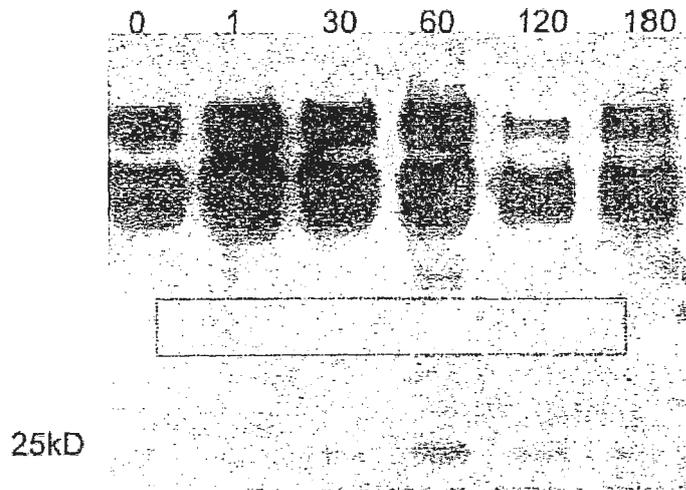


FIG. 8

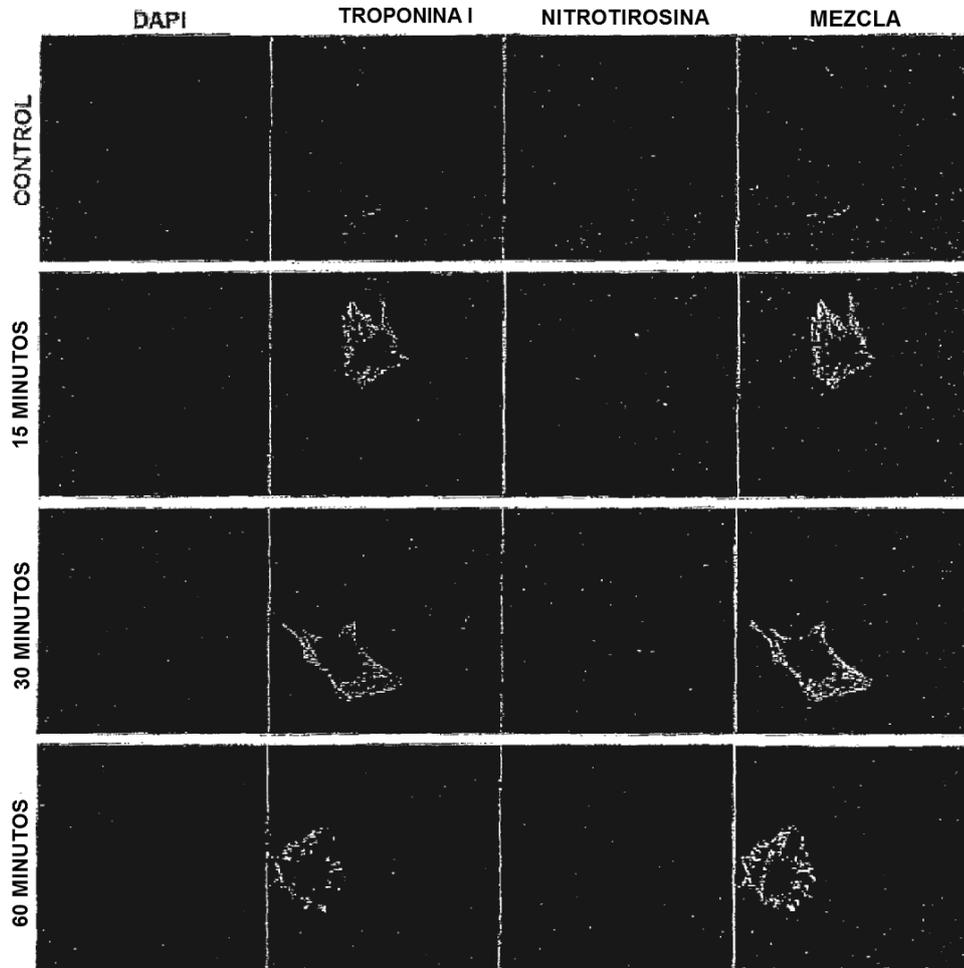


FIG. 9

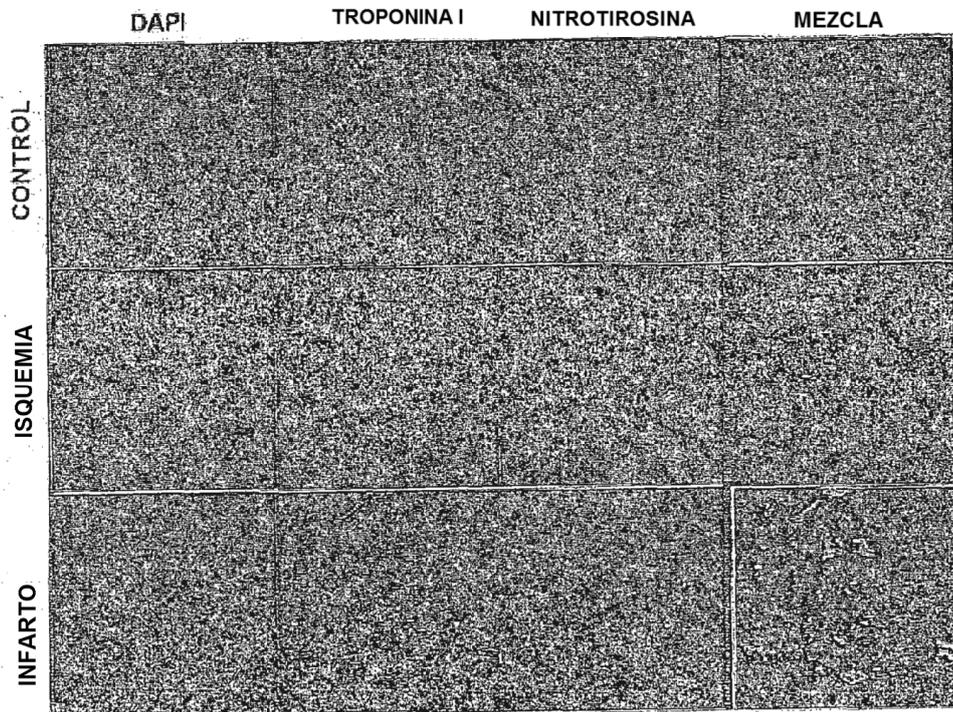


FIG. 10

Inicio	Fin	Secuencia	Modificaciones	Tiempo de retención (min)	Intensidad
121	121	(H) NITROZADULTOR (I)		46,84	1256737
149	143	(R) ISADANODALLSAR (A)		49,69	3642702
154	154	(R) UNDESSEMER (R)		50,05	2073547
60	80	(R) COPPELACILAFELGOLC (Q)	Carbamidomethyl C (1), Carbamidoethyl C (18)	116,84	941637
149	162	(R) ISARFANICALLALA (A)	Oxidation K (7)	82,83	904268
164	164	(R) NITRALSONEGR (R)	Oxidation M (8)	41,99	777936
163	170	(R) NITRALSON (A)		31,82	637864
137	136	(R) NITRALSON (A)		51,88	463953
11	11	(R) NITRALSON (A)		30,49	278459
155	170	(R) NITRALSON (A)		38,17	255585
121	131	(R) NITRALSON (A)	Oxidation Q (10)	69,38	204922
149	162	(R) ISADANODALLSAR (A)	Oxidation M (6), Oxidation N (7)	57,53	149774
59	68	(R) NITRALSON (A)		22,14	86630
149	162	(R) ISADANODALLSAR (A)	Oxidation Q (2)	111,56	66213
80	99	(R) COPPELACILAFELGOLC (Q)	Carbamidomethyl C (1), Oxidation Q (2), Carbamidoethyl C (18)	124,81	62903
153	153	(R) NITRALSONEGR (R)	Oxidation M (9)	33,96	53206
121	131	(R) NITRALSON (A)		66,84	49172
51	51	(R) NITRALSON (A)	Oxidation Q (5)	111,28	48227
133	131	(R) NITRALSON (A)	Oxidation N (4)	76,38	47418
11	11	(R) NITRALSON (A)		26,07	39291
147	162	(R) ISADANODALLSAR (A)	Oxidation M (9)	89,12	35222
107	117	(R) NITRALSON (A)	Allylation (6)	51,72	35058
153	170	(R) NITRALSON (A)		31,84	22079
121	135	(R) NITRALSON (A)	Oxidation Q (10)	132,49	15074
153	208	(R) NITRALSON (A)	Oxidation N (2)	51,48	13152
196	204	(R) NITRALSON (A)	Oxidation M (6)	42,01	13112
11	11	(R) NITRALSON (A)		30,52	12858
117	131	(R) NITRALSON (A)		66,84	11754
126	131	(R) NITRALSON (A)		66,84	11745
198	205	(R) NITRALSON (A)		50,57	10772
194	158	(R) NITRALSON (A)		58,03	10107
154	204	(R) NITRALSON (A)	Oxidation M (6)	42,00	10105
159	204	(R) NITRALSON (A)	Oxidation M (9)	41,99	9620
173	181	(R) NITRALSON (A)		66,84	5490
121	126	(R) NITRALSON (A)		66,84	5251
124	131	(R) NITRALSON (A)		66,83	5165
166	170	(R) NITRALSON (A)		31,83	7714
164	194	(R) NITRALSON (A)		56,02	7147
157	170	(R) NITRALSON (A)		31,83	6728

Mapa de cobertura de P19429

1	MADESSDAAR		RRSSNYRAYA	TEPRAKKLSK	ISTSRKLOLK
51	TLLUULAKK	TERREARRAG	EMPRALSIRB	OPILARRKSG	RELOOLCROL
101	HARVDHVLLE	RYDLKAVTE		TEPRKPKPK	RPLKRRVRS
151	ARRSSDAAR	RRKRRKRR	AHLKQVKKED	TEKENREVED	KRRKRRKRR
201	RRKRRKRR				



FIG. 11

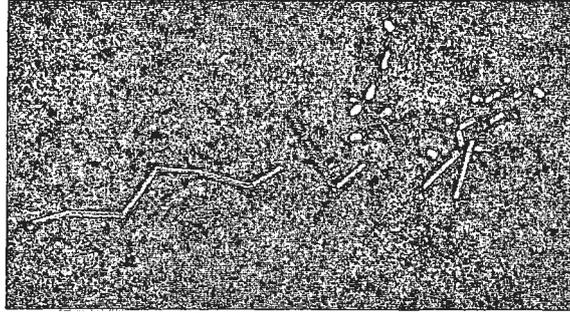


FIG. 12

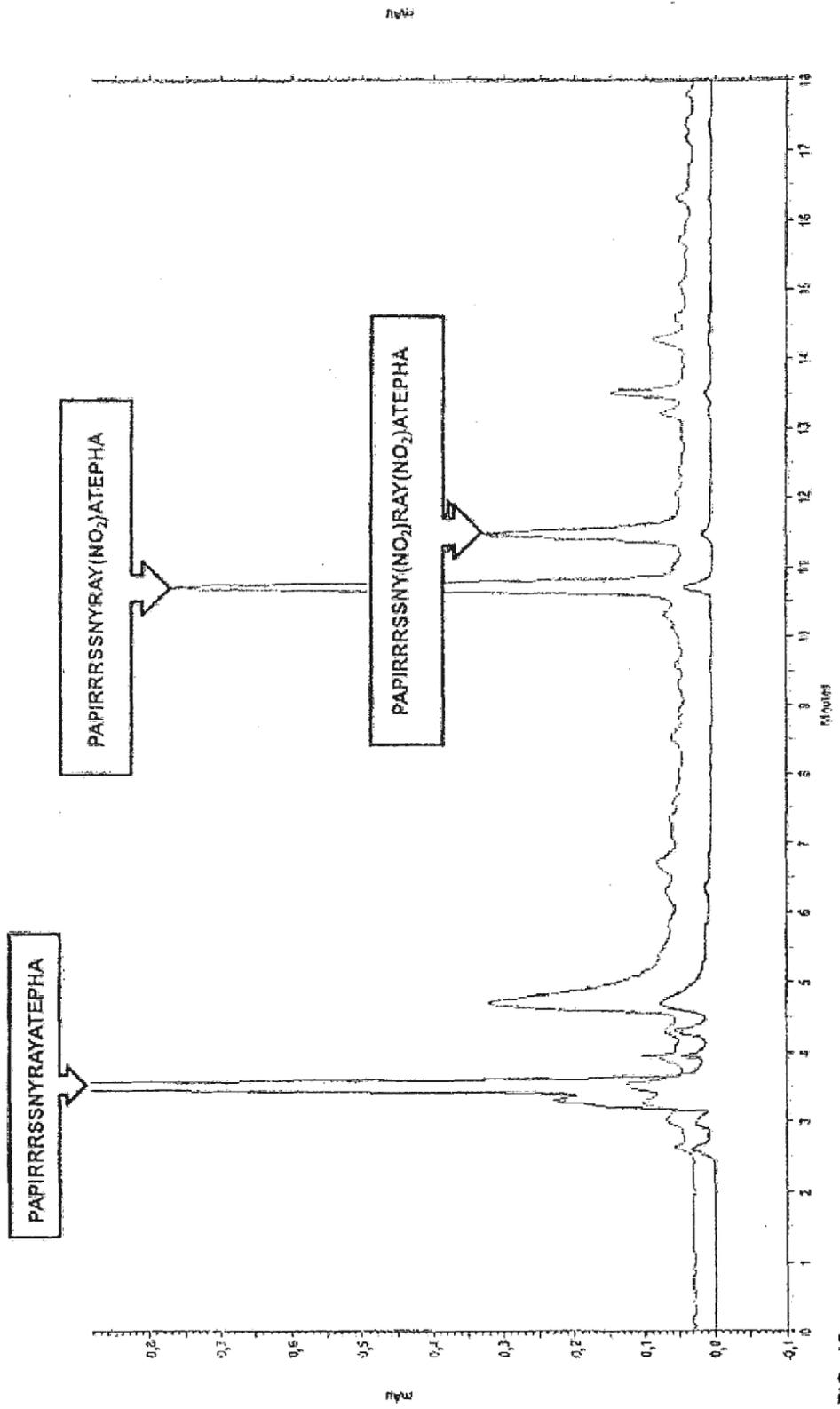


FIG. 13