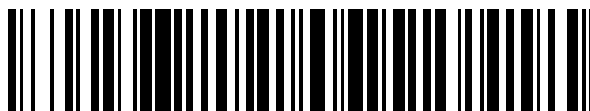


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 850**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2011** **PCT/US2011/044586**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012** **WO12012469**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2011** **E 11810311 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2596010**

54 Título: **Biomarcadores de señal**

30 Prioridad:

19.07.2010 US 365677 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2017

73 Titular/es:

OTAGO INNOVATION LIMITED (100.0%)
87 St. David Street
Dunedin, NZ

72 Inventor/es:

PEMBERTON, CHRISTOPHER, JOSEPH y
RICHARDS, ARTHUR, MARK

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 629 850 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

Biomarcadores de señal

5 **Campo**

Esta invención se refiere a diagnósticos y tecnologías relacionadas, incluyendo diagnósticos relacionados con péptidos de señal natriuréticos de tipo C y kits, usos y aplicaciones para los mismos. La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier objeto identificado en la solicitud como “invención”, “realización”, “aspecto”, etc., que exceda el alcance de la invención tal como se representa mediante las reivindicaciones, no forma parte de la invención reivindicada, sino que solo sirve como información básica para comprender mejor la invención.

15 **Antecedentes**

Lo descrito a continuación incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No se trata de un reconocimiento de que cualquier información proporcionada en la presente memoria sea de la técnica anterior, o relevante, para las invenciones descritas o reivindicadas en la presente invención, o que cualquier publicación o documento al que se haga referencia específica o implícitamente sea la técnica anterior.

Los síndromes coronarios agudos (SCA) abarcan un amplio espectro de acontecimientos isquémicos cardíacos que van desde angina inestable hasta infarto agudo de miocardio (IAM). El IAM se presenta como el más grave de estos acontecimientos y por lo tanto requiere un diagnóstico rápido y preciso. Los pacientes que presentan dos o más de las características descritas (antecedentes de molestias torácicas isquémicas, cambios evolutivos en los registros del electrocardiograma (ECG) seriado y un aumento y descenso de los biomarcadores cardíacos plasmáticos) se identifican claramente como que sufren un IAM.¹ Sin embargo, una proporción significativa de los pacientes (40 %-50 %) que presentan sospecha de IAM no tienen cambios seriados en el ECG ni síntomas típicos poniendo así gran énfasis en el análisis de biomarcadores para un diagnóstico preciso.^{1,2} El diagnóstico precoz exacto del infarto de miocardio facilita la introducción inmediata del tratamiento de reperfusión, incluyendo revascularización percutánea o trombolítica efectiva y terapia anticoagulante adjunta y antiplaquetaria. Tales tratamientos son progresivamente menos eficaces para reducir la mortalidad y la morbilidad con cada hora de retraso en el diagnóstico y manejo.³⁻⁶ Dada la necesidad de una toma de decisiones acelerada en esta situación clínica, existe un interés considerable en la identificación de biomarcadores, particularmente biomarcadores circulantes, que proporcionan un diagnóstico precoz y específico de síndromes y trastornos cardíacos agudos, en particular IAM.¹ Los biomarcadores propuestos incluyen creatina quinasa MB (CK-MB), troponina T (TnT), troponina I (TnI), BNP, N-BNP (también conocido como NP-BNP), el péptido de señal BNP (BNP-SP) y mioglobina. Sin embargo, el tiempo hasta la detección o la elevación anormal de los biomarcadores cardíacos plasmáticos puede ser de hasta 6 horas (mioglobina, CK-MB) a 12 horas o más (TnT, TnI, BNP, N-BNP) con picos que a menudo no ocurren hasta 24-48 horas después del inicio de la lesión, imponiendo una ventana de retraso en el diagnóstico y tratamiento precisos.³⁻⁶ Además, tanto la mioglobina como la CK-MB no son específicas y pueden ser secretadas de fuentes extracardíacas, especialmente durante el traumatismo o la cirugía.¹ Existe la necesidad de un marcador o conjunto de marcadores que proporcione información temprana y específica sobre síndromes cardíacos agudos y trastornos tales como lesión cardíaca aguda, particularmente durante las primeras horas de presentación clínica.

También existe la necesidad de medios para controlar placas vasculares vulnerables, que proporcionan el sustrato para acontecimientos cardíacos agudos. La aterosclerosis es un problema de salud importante con una mortalidad anual de 500.000 muertes en los Estados Unidos solamente. Actualmente se acepta que los síndromes coronarios agudos son más frecuentemente el resultado de la rotura de placas ateromatosas vulnerables que son angiográficamente modestas en gravedad. “Placa vulnerable” se utiliza para referirse a un subgrupo de placas moderadamente estenóticas pero inestables que son propensas a romperse y, como resultado, causan paro cardíaco repentino. Aunque la angiografía coronaria es ampliamente utilizada para ilustrar y controlar el estrechamiento luminal de la arteria coronaria, no es capaz de proporcionar una identificación selectiva de placas vulnerables. La mayoría de los enfoques alternativos para identificar placas vulnerables se basan en enfoques endovasculares invasivos. Por lo tanto, el desarrollo de tecnología no invasiva que permita distinguir a las placas vulnerables de las más estables es crítico y urgentemente necesario para reducir la morbilidad y la mortalidad de los pacientes ateroscleróticos. Sería altamente deseable si los métodos y dispositivos estuvieran disponibles para detectar la placa aterosclerótica inestable, independientemente del grado de estrechamiento del diámetro luminal, y tratarlo antes de la angina inestable y/o infarto agudo de miocardio y sus consecuencias.⁷

De acuerdo con los Institutos Nacionales de Salud (Anuncio del Programa PA-09-196, “Estudios complementarios sobre lesión renal aguda, enfermedad renal crónica y enfermedad renal terminal. Acceso a la información de ensayos clínicos, estudios epidemiológicos y bases de datos”), la carga económica para la salud pública y de la enfermedad renal crónica en los Estados Unidos es sustancial. La diabetes y la hipertensión son las principales causas de la enfermedad renal crónica. El número de nuevos casos de enfermedad renal terminal en 2006 superó los 110.000 y el número de pacientes sometidos a tratamiento fue superior a 500.000. A medida que la población de los Estados Unidos sigue envejeciendo, se prevé que el número de nuevos casos de enfermedad renal terminal

también aumentará. Se ha estimado que aproximadamente 26 millones de personas tienen enfermedad renal crónica en los Estados Unidos. La insuficiencia renal aguda en pacientes hospitalizados es también un problema significativo en los Estados Unidos, que va desde el 1-15 % de los pacientes hospitalizados. El manejo médico de la insuficiencia renal aguda ha consistido tradicionalmente principalmente en los cuidados médicos de apoyo, con
 5 terapia de reemplazo renal en los casos más graves. A pesar de estas intervenciones en la insuficiencia renal aguda, sin embargo, las tasas de mortalidad en los pacientes afectados siguen siendo muy altas (> 50 % en algunas series).

Del mismo modo, la insuficiencia renal crónica (IRC) tiene una alta mortalidad y morbilidad, para lo cual no hay
 10 terapia específica, excepto los cuidados médicos de apoyo.⁸ Histológicamente, la IRC isquémica se caracteriza por necrosis tubular aguda; sin embargo, una limitación importante en el abordaje de la enfermedad es la falta de diagnósticos clínicamente factibles para la detección temprana. La identificación temprana de la enfermedad renal crónica y la detección oportuna de la progresión son desafíos a los que se enfrenta la comunidad mundial de nefrología, especialmente debido a la disponibilidad de una serie de prometedoras intervenciones primarias y
 15 secundarias para desacelerar la progresión. Con el fin de controlar los costes, los médicos tendrán que disminuir las tasas de progresión de la enfermedad renal crónica a la enfermedad renal terminal (ERT). Los marcadores actuales de la enfermedad renal y la progresión de la enfermedad renal son la creatinina sérica y la concentración de proteínas urinarias, incluida la microalbuminuria.⁸ Se ha demostrado que la pendiente de la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) predice el momento de la ERT y en múltiples estudios se ha demostrado que el nivel de proteinuria se correlaciona con las tasas de progresión de la enfermedad renal. Sin embargo, su capacidad para reconocer la enfermedad renal temprana es limitada. La concentración de creatinina sérica depende de la edad, sexo, raza, masa muscular, peso, grado de esfuerzo físico y diversidad de medicamentos y la correcta interpretación de la función renal basada en la creatinina sérica requiere fórmulas complejas. Aunque la proteína urinaria es sensible a la enfermedad renal progresiva, su aparición se produce después de que ya se haya producido daño
 20 renal significativo. Para una máxima utilidad, un biomarcador de daño renal temprano y/o progresivo debe ser positivo en el punto más temprano posible, preferiblemente en ese punto que comienza a producirse el daño renal. Sigue habiendo una gran necesidad de descubrimiento y validación de marcadores relevantes, en particular para la detección temprana.⁸

Un problema persistente para la Agencia Mundial Antidopaje es el uso indebido de hormonas peptídicas/proteínas como la eritropoyetina (EPO) como agentes potenciadores del rendimiento por los atletas. En la actualidad, las muestras de sangre y orina se analizan mediante metodologías electroforéticas o de inmunoensayo para detectar la presencia de sustancias prohibidas. Aparte de cualquier problema técnico inherente, estas determinaciones deben tener en cuenta los niveles fisiológicos aceptados de hormonas peptídicas endógenas, así como determinar la
 30 presencia de sus formas sintéticas o recombinantes. Sin embargo, también se reconoce que para algunas hormonas de este grupo, las nuevas generaciones de su forma sintética o recombinante también han dificultado su detección cuando se usan mal en el deporte y que esta cuestión se complica aún más por 1) los desarrollos tecnológicos en la producción de EPO sintética o recombinante, (2) la administración controlada en puntos de tiempo para evitar la detección, (3) las dificultades resultantes para confirmar niveles de sustancia que exceden la norma aceptada y (4)
 40 los registros indeterminados que reflejan la variabilidad de proteína en la unión no específica de anticuerpos secundarios (particularmente en los concentrados de orina) y los cambios no específicos inducidos por enzimas en las pruebas isoelectrónicas.

Las realizaciones de la presente invención se refieren al descubrimiento de nuevos marcadores tempranos para el diagnóstico, incluyendo el uso en la evaluación, diagnóstico y pronóstico de, por ejemplo, síndromes coronarios agudos, trastornos y lesiones renales agudos y crónicos y placa vulnerable, así como para el uso en la detección de dopaje por EPO, por ejemplo, por deportistas.

Breve resumen

Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria tienen muchos atributos y realizaciones que incluyen, pero no se limitan a, las establecidas o descritas o referenciadas en este Breve resumen. No se pretende que se incluya todo y las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria no están limitadas a, ni por las características o realizaciones identificadas en este Breve resumen, que se incluye con fines ilustrativos
 55 únicamente y no como restricción.

El solicitante ha descubierto fragmentos de péptido de señal del péptido natriurético de tipo C (CNPsp) y de la eritropoyetina (EPOsp). El solicitante también ha descubierto que estos fragmentos de péptidos de señal son detectables por ensayo de muestras biológicas, incluyendo por ensayo de muestras de material biológico que
 60 contienen material liberado en la circulación. El documento WO2005/052593 divulga métodos para determinar niveles de secuencias de péptidos de señal.

La invención se refiere a péptidos de señal y fragmentos de péptidos de señal de péptidos natriuréticos de tipo C y eritropoyetinas, y a métodos para su detección (incluyendo la detección de EPOsp y/o CNPsp y EPOsp y/o la inmunorreactividad del fragmento de CNPsp), por ejemplo, así como agentes de unión y ensayos útiles para ello. La invención también se refiere y su uso en el pronóstico, diagnóstico y control de acontecimientos o trastornos

biológicos o estados que tienen como resultado su liberación en fluidos corporales que pueden muestrearse. Ejemplos de acontecimientos biológicos, trastornos y estados para el pronóstico, diagnóstico y control incluyen trastornos cardiovasculares agudos y crónicos, placa aterosclerótica vulnerable, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmia cardíaca, síndromes coronarios agudos, enfermedad arterial crónica, enfermedades, trastornos, lesiones y afecciones renales agudas y crónicas.

El uso y la medición de la inmunorreactividad de EPOsp y/o CNPsp, EPOsp y/o CNPsp, o fragmentos, incluyendo fragmentos de péptidos inmunorreactivos, de EPOsp y CNPsp, proporcionan capacidades de detección y discriminación superiores en comparación con los marcadores estándar existentes. En este sentido, se observa un tiempo mucho más rápido hasta alcanzar los niveles máximos en la sangre y la naturaleza específica de cada marcador para la afección. Esta última surge de la localización específica en el órgano de cada fragmento de péptido de señal. Por lo tanto, la EPOsp se libera específicamente del riñón, mientras que el CNP se libera del corazón y de los vasos sanguíneos. Además, debido a que los péptidos de señal tienen una semivida más corta en sangre en comparación con los marcadores existentes, tienen la capacidad de subir y bajar más rápidamente, detectando la enfermedad activa subyacente. Esto no puede decirse de los marcadores existentes, que tienen semividas largas y, por lo tanto, poseen niveles en la sangre que no responden tan rápidamente a la enfermedad activa. La EPOsp humana tiene la secuencia MGVHECPAWLWLLLSLLPLGLPVLG (SEQ ID NO:1) Los fragmentos de EPOsp humana incluyen, por ejemplo, EPOsp (1-9) y EPOsp (18-27), que pueden escribirse como sigue:

MGVHECPAW (SEQ ID NO:2)

SLPLGLPVLG (SEQ ID NO:3)

El CNPsp humano tiene la secuencia MHLSQ LLACA LLLTL LSLRP SEA (SEQ ID NO:4).

Los fragmentos de CNPsp humano incluyen, por ejemplo, CNPsp (1-13) y CNPsp (14-23), que pueden escribirse como sigue:

MHLSQLLACALLL (SEQ ID NO:5)

TLLSLRPSEA (SEQ ID NO:6)

Los análogos animales de estos péptidos y fragmentos de señal, así como variantes de los mismos útiles para preparar agentes de unión a estos péptidos y fragmentos de señal humanos y animales están dentro de la invención.

Las invenciones incluyen métodos para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento o trastorno biológico en un sujeto en el que el acontecimiento se correlaciona con la liberación de CNPsp o EPOsp o fragmentos de los mismos en la circulación o para la evaluación de dopaje con EPO. En un aspecto, un método comprende medir el nivel de uno o más de estos péptidos o fragmentos de señal en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de los fragmentos de péptido de señal con niveles individuales o combinatorios de dichos fragmentos de péptido de señal de un control o población de control (incluyendo controles históricos), en el que una desviación en el nivel medido respecto al nivel de control es indicativa de un acontecimiento biológico. También pueden medirse los péptidos de señal.

El solicitante ha descubierto también que los fragmentos de EPOsp y/o CNPsp pueden usarse para evaluar la presencia de síndromes cardíacos agudos y que uno o más de dichos fragmentos de EPOsp y/o CNPsp son generalmente más altos en las primeras horas después del inicio de, o en la presentación clínica con sospecha de síndrome coronario agudo.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un SCA en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de fragmentos de EPOsp y/o CNPsp en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dichos fragmentos de EPOsp y/o CNPsp con el nivel de dichos fragmentos de EPOsp y/o CNPsp de uno o más controles en los que un nivel medido de dichos fragmentos de EPOsp y/o CNPsp superior al nivel de control es indicativo de un SCA.

Los niveles elevados de fragmentos de EPOsp y/o CNPsp son generalmente diagnósticos de IM y angina.

También se pueden usar niveles elevados de fragmentos de EPOsp y/o CNPsp como diagnóstico de la insuficiencia cardíaca.

También se pueden usar niveles elevados de fragmentos de EPOsp y/o CNPsp como diagnóstico de la enfermedad vascular y/o aterosclerosis. Los CNPsp, por ejemplo, se pueden elevar aproximadamente en un 50 % o más sobre lo normal en estas afecciones.

Los niveles elevados de fragmentos de CNPsp también se pueden utilizar para diagnósticos de hipertensión.

Los niveles elevados de fragmentos de CNPsp también pueden utilizarse para diagnósticos de síncope, una pérdida temporal de conciencia y postura usualmente relacionada con un insuficiente flujo sanguíneo temporal al cerebro. El síncope ocurre con más frecuencia cuando la presión sanguínea es demasiado baja (hipotensión) y el corazón no bombea un suministro normal de oxígeno al cerebro.

También se pueden usar los niveles elevados de EPOsp y/o fragmentos de EPOsp para la evaluación del dopaje con EPO. Se podría esperar que una relación plasmática de inmunorreactividad EPO/EPOsp (indicativa de un EPOsp y/o de un fragmento o fragmentos de EPOsp) sea superior a 1000:1, por ejemplo, particularmente durante la fase aguda de administración.

La invención también incluye métodos para controlar una respuesta al tratamiento de un acontecimiento o trastorno biológico, particularmente un síndrome cardíaco agudo en un sujeto, comprendiendo el método la medición del nivel de uno o más de los fragmentos de péptido de señal a los que se hace referencia en la presente memoria, por ejemplo fragmentos de EPOsp y/o fragmentos de CNPsp, en una muestra biológica del sujeto, preferiblemente antes y después del tratamiento, y comparando el nivel de dichos fragmentos con el nivel de dichos fragmentos de un control, en el que un cambio en el nivel o nivel medido (por ej., un nivel histórico o base) de fragmentos respecto al nivel de control es indicativo de una respuesta al tratamiento.

La invención también incluye métodos para diagnosticar o evaluar la enfermedad o la insuficiencia o lesión renal aguda y crónica en un sujeto, en los que la medición del nivel de EPOsp muestra una correlación negativa con la TFG (un indicador de la función renal). Los niveles plasmáticos de EPOsp, por ejemplo, están elevados en pacientes con enfermedad renal crónica y en aquellos con insuficiencia cardíaca comparados con los normales. La proporción de EPOsp a EPO es de aproximadamente 6 en salud normal y esta asciende a aproximadamente 10 en la enfermedad renal y cae a aproximadamente 4 en pacientes con insuficiencia cardíaca.

La invención también incluye métodos para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome cardíaco agudo en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de uno o más fragmentos de EPOsp y/o CNPsp en una muestra biológica obtenida del sujeto dentro de las primeras 12 horas o más, preferiblemente las primeras 4-6 horas o menos, desde el inicio o presentación clínica con un SCA o sospecha de SCA, comparando el nivel medido de dichos uno o más fragmentos de EPOsp y/o CNPsp con el nivel de uno o más de los fragmentos de EPOsp y/o CNPsp de un control (por ej., un control histórico o un nivel de control conocido), en el que un nivel medido de uno o más fragmentos de EPOsp y/o CNPsp superiores al nivel de control es indicativo de un SCA.

En términos generales, las invenciones se pueden usar para predecir, diagnosticar o controlar cualquier acontecimiento en el cual uno o más EPOsp y/o CNPsp y/o fragmentos de los mismos son liberados de células, por ejemplo, en la circulación u otro fluido biológico o tejido.

En una realización de los métodos de la invención, en particular para un trastorno cardiovascular o renal, o sospecha de un trastorno cardiovascular o renal, se mide el nivel o los niveles de uno o más de los EPOsp y/o CNPsp y/o fragmentos de los mismos dentro de aproximadamente cuarenta y ocho horas, aproximadamente veinticuatro horas, aproximadamente doce horas, aproximadamente diez horas, aproximadamente ocho horas, aproximadamente seis horas, aproximadamente cuatro horas, aproximadamente dos horas o aproximadamente una hora o aproximadamente 30 minutos después de la presentación del paciente con un trastorno o sospecha de trastorno.

En una realización, los métodos de la invención son métodos *in vitro* y la muestra biológica es sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido intersticial o tejido del corazón.

En una realización, la etapa de medición comprende detectar la unión entre uno o más fragmentos diana y un agente de unión que se une a dicho fragmento o fragmentos con la especificidad y selectividad deseadas. La etapa de medición puede comprender:

(a) reunir una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene uno o más fragmentos diana con un agente o agentes de unión, con o sin una etapa de incubación y

(b) medir el nivel de péptido o péptidos señal o fragmentos diana unidos.

El agente de unión puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, o cualquier molécula que comprende un fragmento de unión al antígeno del mismo. Más comúnmente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal, quimérico o humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el agente de unión es, por ejemplo, un anticuerpo de cadena única o scFv. En una realización, el agente de unión anti-fragmento es, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que reconoce fragmentos en u obtenidos de una muestra biológica.

En otra realización, los niveles de uno o más fragmentos diana se miden usando espectroscopia de masas.

Uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos), u otros fragmentos de péptidos de señal, pueden unirse usando un agente de unión de la invención. Otros fragmentos de EPOsp y CNPsp están también dentro de la invención.

Las moléculas que están unidas por el agente o agentes de unión pueden ser las moléculas de péptido de señal humanas de longitud completa (SEQ ID NOS:1, 4) o una variante antigénica o fragmento de las mismas. En una realización, el fragmento tiene al menos cuatro aminoácidos contiguos de longitud. El agente o agentes de unión pueden, por ejemplo, unirse al extremo N terminal o al extremo C terminal de un EPOsp y/o CNPsp. Los fragmentos pueden ser, por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS:2, 3, 5 y/o 6.

La unión de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos), u otros fragmentos de péptidos de señal, se pueden medir, por ejemplo, usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpo u otros agentes de unión que se inmovilizan en una fase sólida.

Los niveles de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a la SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos), u otros fragmentos de péptidos de señal, pueden medirse útilmente, por ejemplo, mediante RIA, ELISA, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico, espectrometría de masas o ensayo inmunoradiométrico. Los métodos de la invención incluyen el uso de agentes de unión y ensayos para uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo el ensayo la determinación de la presencia o cantidad de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, en la muestra utilizando cualquier método conocido.

La invención también proporciona ensayos, incluyendo ensayos para los usos descritos en la presente memoria, para uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos), u otros fragmentos de EPOsp y/o CNPsp, que comprenden, por ejemplo:

- (a) la unión de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) de una muestra; y
- (b) medir el nivel de uno o más péptidos o fragmentos de péptidos unidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos).

La invención proporciona también un ensayo o ensayos para uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5 o 6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptido de señal, para su uso en la predicción, el diagnóstico o el control de acontecimientos biológicos o trastornos en un sujeto. En una realización, el ensayo es un ensayo *in vitro*.

La invención también incluye fragmentos aislados, sustancialmente purificados, o purificados, así como sintéticos, que corresponden, por ejemplo, a cualquiera de las SEQ ID NOS:2, 3, 5 y/o 6.

Los métodos relacionados con el corazón de la invención pueden comprender además la medición del nivel de uno o más marcadores no EPOsp y no CNPsp de, por ejemplo, un SCA, y la comparación de los niveles frente a los niveles de marcadores de un control en el que una desviación en el nivel medido respecto a un nivel de control, junto con un nivel medido de uno o más fragmentos de EPOsp y/o CNPsp que es más alto que el nivel de control de uno o más fragmentos de EPOsp y/o CNPsp, es predictivo o diagnóstico del SCA o puede ser utilizado para controlar dicho SCA. Los marcadores para su uso en el contexto del síndrome coronario agudo incluyen troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP, BNP-SP, ANP, ANP-SP, LDH, aspartato aminotransferasa y proteína cardíaca específica de unión a ácidos grasos (H-FABP).

En otro aspecto, la presente invención proporciona también un agente de unión para uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos. En una realización, el agente de unión de la invención se une a una de las SEQ ID NOS:2, 3, 5 y/o 6. En otra realización, el agente de unión se une a una variante o fragmento de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal.

El agente de unión es útil para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento o trastorno biológico que se correlaciona con la liberación de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5 o 6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos), u otros fragmentos de péptidos de señal, incluyendo, por ejemplo, en la circulación. Tales acontecimientos o trastornos incluyen síndromes cardíacos agudos en un sujeto.

La invención también proporciona un anticuerpo anti-EPOsp y/o anticuerpo anti-CNPsp o fragmento de unión al antígeno del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal, quimérico o humanizado, por

ejemplo. La invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos que se unen a fragmentos de EPOsp y/o CNPsp, incluyendo fragmentos identificados por las SEQ ID NOS:2, 3, 5 y/o 6.

La invención también se refiere al uso de un agente de unión en la fabricación de un ensayo para uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, para evaluar un acontecimiento o trastorno biológico en un sujeto o para el uso de un agente de unión en la fabricación de una herramienta de pronóstico, diagnóstico o control para evaluar un acontecimiento o trastorno biológico en un sujeto y/o su tratamiento, o para la evaluación del uso indebido o dopaje con EPO. En una realización, el acontecimiento o trastorno se correlaciona con la liberación de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, en la circulación que incluye o son la consecuencia de una enfermedad o lesión renal crónica, insuficiencia cardíaca, hipertensión, síncope, enfermedad vascular incluyendo aterosclerosis, o un síndrome cardíaco agudo incluyendo infarto de miocardio y angina, uso indebido de EPO o dopaje.

La invención también se refiere al uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención en la fabricación de una herramienta de pronóstico, diagnóstico o control para evaluar un acontecimiento o trastorno biológico que se correlaciona con la liberación de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos que corresponden a la SEQ ID NO:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, incluyendo, por ejemplo, en la circulación incluyendo una enfermedad o lesión renal crónica, insuficiencia cardíaca, hipertensión, síncope, enfermedad vascular incluyendo aterosclerosis, o un síndrome o trastorno cardíaco agudo incluyendo infarto de miocardio y angina en un sujeto.

En una realización, la herramienta de pronóstico, diagnóstico o control se calibra para medir los niveles de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a cualquiera de las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptido señal, en el intervalo de, por ejemplo, de 0,1 a 1500 pmol/l, de 0,1 a 500 pmol/l, de 1 a 300 pmol/l, de 10 a 250 o 20 a 150 pmol/l. Además, se pueden encontrar péptidos de señal de eritropoyetina en muestras biológicas, incluidas muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 400 a 4000 pmol/l, aproximadamente 400 a 200 pmol/l, aproximadamente 320 a 520 pmol/l o aproximadamente 400-420 pmol/l o menos. Son detectables niveles de tan solo 5 pmol/l. Los péptidos de señal de angiotensina pueden encontrarse en muestras biológicas, incluyendo muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 10 a 1000 pmol/l, de aproximadamente 5 a 500 pmol/l, aproximadamente 1 a 100 pmol/l o aproximadamente 0,1 a 10 pmol/l o menos. Se pueden detectar niveles de tan solo 0,1 pmol/l. Se pueden encontrar péptidos de señal natriuréticos de tipo C en muestras biológicas, incluyendo muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 50 a 1500 pmol/l, de aproximadamente 25 a 750 pmol/l, de aproximadamente 10 a 500 pmol/l o de aproximadamente 5 a 150 pmol/l o menos. Son detectables niveles de tan solo 2 pmol/l. Los péptidos de señal de endotelina-1 pueden encontrarse en muestras biológicas, incluyendo muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 10 a 200 pmol/l, de aproximadamente 5 a 100 pmol/l, de aproximadamente 10 a 50 pmol/l o de aproximadamente 1 a 20 pmol/l o menos. Se detectan niveles de al menos 1 pmol/l.

En un aspecto, el nivel normal de EPOsp y/o fragmentos de EPOsp, incluyendo SEQ ID NOS:1-3 es de aproximadamente 14 a aproximadamente 90 pmol/l y en uno o más de los estados patológicos o afecciones a los que se hace referencia en la presente memoria es de aproximadamente 30 a aproximadamente 200 pmol/l. Tales niveles se pueden medir, por ejemplo, en sangre o plasma.

En un aspecto, el nivel normal de fragmentos de CNPsp y/o CNPsp, incluyendo las SEQ ID NOS:4-6 es de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 pmol/l y en uno o más de los estados patológicos o afecciones a los que se hace referencia en la presente memoria es de aproximadamente 18 a aproximadamente 55 pmol/l. Tales niveles se pueden medir, por ejemplo, en sangre o plasma.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento o trastorno biológico en un sujeto, comprendiendo el kit un agente de unión contra un péptido o fragmento de péptido correspondiente a una o más de las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal.

En una realización, el kit se calibra para medir los niveles de un péptido o fragmento peptídico correspondiente a una o más de las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, en los intervalos señalados anteriormente.

En una realización, el kit también incluye información y/o instrucciones para llevar a cabo un ensayo usando el agente de unión. El kit también puede incluir información y/o instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento o trastorno biológico incluyendo uno o más de una enfermedad o lesión renal crónica, insuficiencia cardíaca, hipertensión, síncope, enfermedad vascular incluyendo aterosclerosis o un síndrome cardíaco agudo incluyendo infarto de miocardio y angina en un sujeto, a partir del nivel de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 o 6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, medidos en una muestra biológica y comparando el nivel medido con un

nivel de control.

La invención se refiere también al uso de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a las SEQ ID NOS:1-6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos) u otros fragmentos de péptidos de señal, en la preparación de un anticuerpo o fragmento de unión del mismo.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en las cuales

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de EPOsp y CNPsp usando la notación de una letra.

La Figura 2 (panel superior) muestra una curva patrón representativa de un RIA de CNPsp (15-23). (Panel inferior):

las muestras extraídas de los lechos vasculares regionales en los seres humanos muestran que solo el seno coronario cardíaco (CS) y la vena renal (RV) presentaban mayores concentraciones de CNPsp en comparación con los niveles arterial circulante (FA1 y FA2). Esto indica que el corazón es una fuente funcional de CNPsp y que uno puede muestrear una fuente venosa deseada sin necesidad de muestrear una fuente arterial. El péptido de señal puede identificarse en una muestra arterial, pero se puede usar una muestra venosa para identificar la fuente del péptido.

La Figura 3 (panel superior) muestra en los niveles plasmáticos de EPOsp (1-9) una correlación negativa con la TFG (un indicador de la función renal). (Panel central): los niveles plasmáticos de EPOsp están elevados en pacientes con enfermedad renal crónica (mientras que la EPO disminuye notablemente) y en aquellos con insuficiencia cardíaca donde los niveles de EPOsp están elevados (mientras que la EPO aumenta marcadamente) en comparación con los valores normales. (Panel inferior), la relación entre EPOsp (pmol/l) y EPO (mU/l) es aproximadamente 6 en un estado de salud normal. Esto se eleva a aproximadamente 10 en la enfermedad renal y disminuye hasta aproximadamente 4 en pacientes con insuficiencia cardíaca.

La Figura 4 muestra un esquema generalizado de la escisión de los péptidos de señal a partir de moléculas precursoras de prepro péptidos e indica la generación de fragmentos de péptidos de señal detectables previamente desconocidos y no reconocidos.

Figura 5. Resultados del inmunoensayo que muestran **Panel superior:** Concentraciones plasmáticas en serie de CNPsp (14-23) en 8 pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST documentado (IMEST) desde el momento del inicio del dolor torácico en el servicio de urgencias del hospital. **Panel inferior:** TnI concomitante, niveles plasmáticos de CK-MB y mioglobina en los mismos pacientes con IMEST identificados en el panel superior.

La Figura 6 muestra una tabla con los datos de reactividad cruzada de antisuero de EPOsp y CNPsp.

Definiciones

Los síndromes coronarios agudos abarcan un amplio espectro de acontecimientos de isquemia cardíaca, incluyendo infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST en el ECG a la presentación, angina inestable e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST; isquemia cardíaca; lesión cardíaca aguda; daño cardíaco agudo resultante de toxicidad farmacológica aguda y miocardiopatías agudas. Las definiciones descriptivas completas de estos trastornos se encuentran en la referencia 1. Ver, por ej., Figura 5.

La insuficiencia renal aguda (repentina) es la pérdida repentina de la capacidad de los riñones de eliminar los productos de desecho y de concentrar la orina sin perder electrolitos. Hay muchas causas posibles de tal daño del riñón, incluyendo enfermedad y lesión. Incluyen necrosis tubular aguda; enfermedad renal autoinmunitaria; disminución del flujo sanguíneo debido a presión sanguínea muy baja; trastornos que causan la coagulación dentro de los vasos sanguíneos del riñón; infecciones que lesionan directamente el riñón; complicaciones del embarazo y obstrucción del tracto urinario. La enfermedad renal crónica es la pérdida lenta de la función renal con el tiempo. Los síntomas incluyen heces con sangre, olor en la respiración, aparición de hematomas con facilidad, cambios en el estado mental o estado de ánimo, disminución del apetito, disminución de la sensación, especialmente en las manos o los pies, fatiga, dolor de costado (entre las costillas y las caderas), temblor de las manos, hipertensión, sabor metálico en la boca, náuseas o vómitos (que pueden durar días), hemorragias nasales, hipo persistente, sangrado prolongado, convulsiones, movimientos flojos y lentos, inflamación generalizada (retención de líquidos), hinchazón del tobillo, pie y pierna y cambios en la micción (disminución en la cantidad de orina, micción excesiva durante la noche e interrupción completa de la micción).

La enfermedad renal crónica (ERC) empeora lentamente con el tiempo. En las primeras etapas, puede no haber síntomas. La pérdida de función habitualmente lleva meses o años. Puede ser tan lenta que los síntomas no ocurren

hasta que la función renal sea menos de una décima parte de lo normal. La etapa final de la enfermedad renal crónica se llama enfermedad renal terminal (ERT). Los riñones ya no funcionan y el paciente necesita diálisis o un trasplante de riñón. La enfermedad renal crónica y la insuficiencia renal crónica afectan a más de 2 de cada 1.000 personas en los Estados Unidos. La diabetes y la hipertensión son las dos causas más comunes y representan la mayoría de los casos. Las lesiones son otra causa. Muchas otras enfermedades y afecciones pueden dañar los riñones, incluyendo problemas con las arterias que conducen a o que se encuentran dentro de los riñones; defectos congénitos de los riñones (como la enfermedad renal poliquística); algunos medicamentos para el dolor y otros medicamentos; ciertos productos químicos tóxicos; trastornos autoinmunitarios (tales como lupus eritematoso sistémico y esclerodermia); glomerulonefritis por lesión o traumatismo; cálculos renales e infección; nefropatía por reflujo (en la cual los riñones están dañados por el retroceso del flujo de la orina hacia los riñones) y otras enfermedades renales. Los síntomas pueden incluir sensación de malestar general y fatiga, picazón generalizada (prurito) y piel seca, dolores de cabeza, pérdida de peso sin tratar de perder peso, pérdida de apetito y náuseas. Otros síntomas que pueden desarrollarse, especialmente cuando la función renal empeora, incluyen piel anormalmente oscura o clara, dolor óseo, síntomas del cerebro y del sistema nervioso, somnolencia y confusión, problemas de concentración o de pensamiento, entumecimiento de manos, pies u otras áreas, espasmos o calambres musculares, olor en la respiración, aparición frecuente de hematomas, sangrado o sangre en las heces, sed excesiva, episodios frecuentes de hipo, bajo nivel de interés sexual e impotencia, interrupción de los períodos menstruales (amenorrea), problemas de sueño, como insomnio, síndrome de las piernas inquietas y apnea obstructiva del sueño, hinchazón de los pies y las manos (edema) y vómitos, generalmente por la mañana.

Una placa vulnerable es una placa ateromatosa que es particularmente propensa a producir grandes problemas repentinos, como un ataque al corazón o un ictus. La ruptura de la placa, la causa más frecuente de trombosis coronaria, ha sido implicada en la progresión episódica de la estenosis coronaria, como lo demuestra la angiografía secuencial y se asocia a menudo con angina inestable, infarto de miocardio y muerte súbita. Las placas ateroscleróticas que son vulnerables a la ruptura tienen un denso infiltrado de macrófagos y, en menor grado, de linfocitos, dentro de una cápsula fibrosa que se superpone a una masa hipocelular creciente de lípidos. Por lo tanto, la placa vulnerable se caracteriza a menudo como una placa ateromatosa en una pared arterial, que tiene abundantes macrófagos, gotas de lípidos y colesterol, y que está generalmente cubierta por una fina capa fibrosa que puede romperse. La placa rota tiene como resultado la exposición de la sangre al núcleo lipídico y a otros componentes de la placa y se cree que provoca la mayoría de los trombos coronarios. La caracterización de estas placas relativamente menos estenóticas propensas a la erosión o rotura, y el reconocimiento de que contribuyen a la angina inestable y al infarto de miocardio, tiene implicaciones importantes. La identificación temprana de placas potencialmente vulnerables puede conducir a cambios en las indicaciones para los pacientes considerados para cirugía de bypass, angioplastia y otros procedimientos. Ver "Molecular and Physical Characterization of the Vulnerable Plaque" Guía NIH, Volumen 26, Número 37, 7 de noviembre de 1997.

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que tiene una estructura específica que interactúa (se une) específicamente con una molécula que comprende el antígeno usado para sintetizar el anticuerpo o con un antígeno estrechamente relacionado con él. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye ampliamente anticuerpos de longitud completa y puede incluir también fragmentos de unión al antígeno de los mismos. También se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos multivalentes y monovalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos bi-específicos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos que han madurado por afinidad. También se incluyen anticuerpos de cadena sencilla, scFvs y otras moléculas que contienen construcciones de unión al antígeno. Un anticuerpo se une selectivamente o específicamente a un polipéptido o fragmento de EPOsp y/o CNPsp de la invención si el anticuerpo se une preferentemente a la diana, incluyendo, por ejemplo, aquellos que tienen menos de aproximadamente 25 % o menos de aproximadamente 10 % o menos de aproximadamente 1 % o menos de aproximadamente 0,1 % de reactividad cruzada con un polipéptido o fragmento polipeptídico que no es EPOsp y/o no CNPsp. El anticuerpo tendrá cualquier afinidad de unión útil (valor de la constante de disociación (K_d)), para el antígeno o epítipo para los usos descritos y reivindicados en la presente memoria. La afinidad de unión típica puede ser igual a, por ejemplo, 10^{-6} o 10^{-7} M, y más generalmente al menos aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} , 10^{-11} o 10^{-12} M. La afinidad de unión se puede evaluar usando resonancia de plasma superficial, u otros métodos conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "fragmento de unión al antígeno" o "fragmento de anticuerpo" significa una porción del anticuerpo intacto que preferiblemente retiene la mayor parte o la totalidad, o mínimamente al menos una de las funciones normales de ese fragmento de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, puede comprender una región Fv que retiene la totalidad o la mayor parte o parte de la función de la región Fv correspondiente en la región de unión anticuerpo-antígeno intacta. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, diacuerpos, anticuerpos de cadena única (ScFV) y anticuerpos multiespecíficos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo monoclonal" significa un anticuerpo que está dirigido contra un solo antígeno diana. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal a partir de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos en los que cada anticuerpo monoclonal es idéntico y/o se une al mismo epítipo, excepto para las mutaciones naturales que pueden ocurrir en cantidades menores.

Un “anticuerpo aislado” es un anticuerpo identificado que ha sido separado o recuperado, o ambos, de un componente de su entorno natural, por ejemplo, separado de otras proteínas incluyendo enzimas y hormonas. En una realización, el anticuerpo se purifica hasta al menos aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % en peso de anticuerpo. La pureza se puede determinar, por ejemplo por el método de Lowry. Generalmente, el anticuerpo se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión “agente de unión”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier material sólido o no sólido capaz de unirse a polipéptidos de EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento o variante de los mismos. En una realización, el término se refiere a cualquier molécula natural o no natural que se une a un polipéptido de EPOsp y/o CNPsp o a un fragmento o variante del mismo. Ejemplos de agentes de unión incluyen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y compuestos de molécula pequeña.

Muestra biológica como se usa en la presente memoria significa cualquier muestra derivada de un sujeto que va a someter a un cribado que contiene o se sospecha que contiene un polipéptido o fragmento de polipéptido de EPOsp y/o CNPsp. La muestra puede ser cualquier muestra conocida en la técnica en la que se pueda detectar la diana. Se incluyen líquidos corporales como plasma, suero, sangre (incluyendo muestras arteriales y/o venosas), orina, saliva, líquido intersticial, sinovial, cefalorraquídeo, linfático, seminal, amniótico, pericárdico y ascitis, así como tejidos, tales como tejidos cardíaco y renal, pero sin limitarse a los mismos.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico capaz de unión específica a una inmunoglobulina y/o receptor de linfocitos T. Es decir, un sitio en un antígeno al que se unen los anticuerpos o responden los linfocitos B y/o T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas y características de carga específicas. Un epítipo incluye generalmente 3, 5 o habitualmente 8-10 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos contiguos o no contiguos, yuxtapuestos por plegamiento terciario.

Aproximadamente 2 o 4 a aproximadamente 12 horas después del inicio de los síntomas o la presentación clínica, incluye desde 1 minuto hasta e incluyendo aproximadamente 240 a aproximadamente 720 minutos desde el inicio de, o presentación en un centro médico, por ejemplo, con SCA, u otro trastorno o sospecha de trastorno como se describe en la presente memoria. Las mediciones se pueden realizar aproximadamente 10 horas (desde 1 minuto hasta aproximadamente 600 minutos), aproximadamente 8 horas (desde 1 minuto hasta e incluyendo aproximadamente 480 minutos), aproximadamente 6 horas (desde 1 minuto hasta e incluyendo aproximadamente 360 minutos), aproximadamente 4 horas (desde 1 minuto hasta e incluyendo aproximadamente 240 minutos), aproximadamente 2 horas (desde 1 minuto hasta e incluyendo aproximadamente 120 minutos) o aproximadamente 1 hora (desde 1 minuto hasta e incluyendo aproximadamente 60 minutos) después del inicio o la presentación, 5 a aproximadamente 45 minutos, 15 a aproximadamente 40 minutos, 20 a aproximadamente 35 minutos, o aproximadamente 25 a 30 minutos después del inicio o presentación.

Un nivel “superior” o “inferior” al de un control, o un cambio o desviación de un control en una realización es estadísticamente significativo. Se puede considerar que existe un nivel superior, un nivel inferior, una desviación o un cambio desde un nivel de control o un nivel de control medio o histórico, si el nivel difiere del nivel de control en aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente 20 % o más, o aproximadamente 50 % o más en comparación con el nivel de control. Estadísticamente significativo puede calcularse alternativamente como $P \leq 0,05$. Los niveles más altos, los niveles más bajos, la desviación y los cambios también pueden determinarse mediante el uso de límites de referencia de ensayo o intervalos de referencia. Estos pueden ser calculados a partir de la evaluación intuitiva o métodos no paramétricos. En general, estos métodos pueden calcular los fractiles 0,025 y 0,975 como $0,025 * (n + 1)$ y $0,975 (n + 1)$. Tales métodos son bien conocidos en la técnica.^{9,10} La presencia de un marcador ausente en un control puede ser visto como un nivel más alto, desviación o cambio. La ausencia de un marcador presente en un control puede considerarse como un nivel inferior, una desviación o un cambio.

Se incluyen muestras de cualquier sujeto, tales como sujetos sanos normales sin antecedentes clínicos de acontecimientos o trastornos biológicos, incluyendo diabetes o SCA, y sujetos con diversas SCA incluyendo, pero sin limitarse a, síndromes coronarios agudos: IAM con elevación del segmento ST en el ECG a la presentación, angina inestable e IM agudo sin elevación del segmento ST; isquemia cardíaca; lesión cardíaca aguda; daño cardíaco agudo resultante de la toxicidad farmacológica aguda y miocardiopatías agudas.

El término “miocardiopatías”, como se usa en la presente memoria, se refiere a enfermedades del miocardio en las que se debilita el miocardio o el músculo cardíaco. Esto puede tener como resultado una reducción del bombeo del corazón. Las causas comunes de miocardiopatías son ataques al corazón, infecciones virales, hipertensión, alcoholismo y enfermedades autoinmunitarias.

“Acontecimiento o trastorno biológico” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una serie de acontecimientos en los cuales los polipéptidos o fragmentos de polipéptidos de EPOsp y/o CNPsp son liberados de

células, por ejemplo, en la circulación de un sujeto, incluyendo afecciones agudas y crónicas. Ejemplos de afecciones incluyen enfermedad renal aguda y crónica y enfermedad cardiovascular (incluyendo síndromes coronarios agudos). Ejemplos de afecciones crónicas son insuficiencia cardíaca, IAM y enfermedades cardiovasculares, así como la hipertensión.

EPOsp y/o CNPsp se refieren al péptido de señal completo de la secuencia humana. También se incluyen en los términos EPOsp y/o CNPsp variantes y fragmentos de los mismos. En una realización, un polipéptido de EPOsp y/o CNPsp funciona como un polipéptido de señal, o como un polipéptido antigénico al que puede unirse un anticuerpo. Las variantes y fragmentos de un EPOsp y/o CNPsp incluyen variantes y fragmentos que retienen una o ambas de estas funciones.

El término “que comprende” tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y reivindicaciones significa “que incluye”, es decir, cuando se interpretan enunciados en esta memoria descriptiva y reivindicaciones que incluyen “que comprende”, las características prologadas por este término en cada enunciado tienen que estar todas ellas presentes, pero también pueden estar presentes otras características. Los términos relacionados como “comprender” y “comprendido” deben ser interpretados de manera similar.

El término “polipéptido”, tal como se utiliza en la presente memoria, abarca cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo secuencias de longitud completa en las cuales los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes. Los polipéptidos útiles en la presente invención pueden ser productos naturales purificados, o pueden producirse parcial o totalmente usando técnicas recombinantes o sintéticas. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento de polipéptido, una variante de polipéptido, o un derivado del mismo. Los polipéptidos de la presente memoria pueden tener longitudes de cadena de al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, o al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, o todos los 23 aminoácidos del EPOsp y/o CNPsp de longitud completa. La referencia a otros polipéptidos de la invención u otros polipéptidos descritos en la presente memoria deben entenderse de manera similar.

Un “fragmento” de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que puede detectarse usando un agente de unión. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento de polipéptido, una variante de polipéptido, o un derivado del mismo.

El término “aislado” tal como se aplica a las secuencias de polipéptidos descritas en la presente memoria se utiliza para referirse a secuencias que se eliminan de su entorno natural celular u otro entorno biológico natural. Una molécula aislada puede obtenerse por cualquier método o combinación de métodos incluyendo técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas. Las secuencias polipeptídicas pueden prepararse mediante al menos una etapa de purificación.

El término “purificado” tal como se usa en la presente memoria descriptiva no requiere pureza absoluta. Purificado se refiere en varias realizaciones, por ejemplo, a por lo menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de homogeneidad de un polipéptido, por ejemplo, en una muestra. El término debe entenderse de manera similar en relación con otras moléculas y construcciones descritas en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término “variante” se refiere a secuencias de polipéptidos diferentes de las secuencias específicamente identificadas, en las que de 1 a 6 o más residuos de aminoácidos se eliminan, se sustituyen o se añaden. Se contemplan sustituciones, adiciones o delecciones de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos. Las variantes pueden ser variantes alélicas de origen natural, o variantes no naturales. Las variantes pueden ser de la misma o de otras especies y pueden abarcar homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polipéptidos útiles en la invención tienen actividades biológicas que incluyen actividad de péptido de señal o propiedades de unión antigénica que son las mismas o similares a las de los polipéptidos progenitores. El término “variante” con referencia a polipéptidos abarca todas las formas de polipéptidos como se definen en la presente memoria.

Las secuencias de polipéptidos variantes presentan al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 71 %, al menos aproximadamente 72 %, al menos aproximadamente 73 %, al menos aproximadamente 74 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 76 %, al menos aproximadamente 77 %, al menos aproximadamente 78 %, al menos aproximadamente 79 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 81 %, al menos aproximadamente 82 %, al menos aproximadamente 83 %, al menos aproximadamente 84 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad con una

secuencia de la presente invención. Con respecto a los polipéptidos, la identidad se encuentra sobre una ventana de comparación de al menos 5 a 7 posiciones de aminoácidos.

Las variantes de polipéptido también abarcan aquellas que exhiben una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserven la equivalencia funcional de esas secuencias, incluyendo aquellas que no se podría esperar razonablemente que se hayan producido por azar. Como se discutió anteriormente, en el caso de las variantes de EPOsp y/o CNPsp, la función puede ser tanto un polipéptido de señal como un polipéptido antigénico, o ambos.

La identidad y similitud de la secuencia del polipéptido se puede determinar de la siguiente manera. La secuencia de polipéptido objeto se compara con una secuencia de polipéptido candidato utilizando BLASTP (del conjunto de programas BLAST, versión 2.2.18 [abril de 2008]) en bl2seq, que está disponible públicamente en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Los parámetros por defecto de bl2seq se utilizan excepto que el filtrado de regiones de baja complejidad debe ser desactivado.

La similitud de las secuencias de polipéptidos puede examinarse utilizando los siguientes parámetros de la línea de comandos de UNIX: bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp. El parámetro -F F desactiva el filtrado de las secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada una de dichas regiones asigna un "valor E" que es el número esperado de veces que se podría esperar ver tal coincidencia por azar en una base de datos de un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias aleatorias. Para valores de E pequeños, mucho menos de uno, esto es aproximadamente la probabilidad de tal coincidencia aleatoria. Las secuencias de polipéptidos variantes muestran comúnmente un valor de E inferior a 1×10^{-5} , menos de 1×10^{-6} , menos de 1×10^{-9} , menos de 1×10^{-12} , menos de 1×10^{-15} , menos de 1×10^{-18} o menos de 1×10^{-21} cuando se compara con cualquiera de las secuencias identificadas específicamente. La identidad de la secuencia polipeptídica también se puede calcular sobre toda la longitud del solapamiento entre las secuencias de un polipéptido candidato y sujeto usando programas de alineación de secuencias globales. EMBOSS-needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235) como se ha expuesto anteriormente son también programas de alineación de secuencias globales adecuados para calcular la identidad de la secuencia de polipéptidos. Se prefiere el uso de BLASTP para su uso en la determinación de variantes de polipéptidos de acuerdo con la presente invención.

En una realización, las variantes incluyen péptidos cuya secuencia difiere de los péptidos de señal y fragmentos humanos en la presente memoria por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica del péptido. Las sustituciones conservadoras incluyen generalmente la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina y fenilalanina, tirosina. Ejemplos de sustituciones conservadoras también pueden encontrarse en las secuencias como se muestra en las listas de secuencias, donde se muestran las sustituciones en diferentes especies de mamíferos en comparación con la secuencia humana. Otras sustituciones conservadoras son conocidas en la técnica.

Pueden usarse también sustituciones no conservadoras y pueden implicar, por ejemplo, el intercambio de un miembro de una clase de aminoácidos (por ejemplo, hidrófobos, neutros, hidrófilos, ácidos, básicos, residuos que influyen en la orientación de la cadena y aromáticos) para un miembro de otra clase.

Otras variantes incluyen péptidos con modificaciones que influyen en la estabilidad del péptido. Tales análogos pueden contener, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que reemplazan a los enlaces peptídicos) en la secuencia peptídica. También se incluyen análogos que incluyen residuos distintos de L-aminoácidos naturales, por ej., D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales, por. ej., beta o gamma aminoácidos y análogos cíclicos.

El término "sujeto", tal como se usa en la presente memoria, es preferiblemente un mamífero e incluye mamíferos humanos y no humanos tales como gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, ciervos, ratones, ratas, primates (incluyendo gorilas, monos rhesus y chimpancés) y otros animales domésticos de granja o del parque zoológico. En una realización, el mamífero es humano.

El término "presentación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la presentación de un sujeto, incluyendo, por ejemplo, al personal médico en un centro médico tal como un consultorio médico, clínica u hospital. Sin embargo, la presentación incluye la presentación de un sujeto ante cualquier persona que utilice la invención, por ejemplo, personal paramédico en una ambulancia.

El término "tratar" o "tratamiento" y "prevenir" se refiere a medidas terapéuticas o profilácticas que alivian, mejoran, manejan, previenen, limitan, detienen o invierten la progresión de un acontecimiento biológico caracterizado por un nivel de polipéptido o fragmento de polipéptido EPOsp y/o CNPsp que muestra una desviación respecto a los niveles de control normales, incluyendo enfermedad cardiovascular, un SCA, enfermedad renal e IAM y otros trastornos y afecciones indicados en la presente memoria. El sujeto puede mostrar una reducción observable o mensurable

(estadísticamente significativa) en uno o más de glucosa, lactato, insulina, ácidos grasos, triglicéridos, TnI, TnT, BNP, N-BNP, BNP-SP, ANP, ANP-SP, creatina quinasa MB, mioglobina LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina, angiotensina II y otros marcadores.

El término "espectrometría de masas", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a métodos de filtrar, detectar y medir iones basados en su relación masa a carga. Ver por ejemplo las patentes US 5.719.060, US 6.204.500, US 6.107.623, US 6.124.137, US 6.225.047, US 6.268.144, US 7.057.165 y US 7.045.366. Las técnicas comunes de espectrometría de masas incluyen ionización de desorción por láser asistida por matriz (MALDI) e ionización de desorción por láser inducida en superficie (SELDI). Ambas pueden ser acopladas con analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF y SELDI-TOF) que permiten el análisis de analitos a niveles de femtomol en pulsos de iones muy cortos.

Versiones de SELDI discutidas por ejemplo en las patentes US 5.719.600, US 6.124.137 y US 6.225.047 que son útiles en esta invención incluyen la captura de afinidad inducida en superficie (SEAC), la desorción pura inducida en superficie (SEND) y la fijación y liberación fotolábil inducida en superficie (SEPAR).

Se pretende que la referencia a un intervalo de números divulgados en la presente memoria (por ejemplo de 1 a 10) también incorpore referencia a todos los números relacionados dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todos los sub-intervalos de todos los intervalos expresamente divulgados en la presente memoria están expresamente divulgados. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados deben considerarse expresamente establecidas en esta solicitud de una manera similar.

Descripción detallada

Se ha pensado durante mucho tiempo que los papeles funcionales de los EPOsp y/o CNPsp se limitaban a controlar el tráfico de las moléculas de origen en el retículo endoplásmico. Una vez que esto se consigue, se ha asumido que el péptido de señal se degrada después sin ser secretado de la célula.¹²

Los inventores han descubierto que los EPOsp y/o CNPsp y los fragmentos de EPOsp y/o CNPsp están presentes en muestras biológicas y aparecen, por ejemplo, en la circulación.

Adicionalmente, los inventores han descubierto que los EPOsp y CNPsp y sus fragmentos son útiles como, por ejemplo, biomarcadores circulantes para una serie de acontecimientos o trastornos biológicos.

El uso y la medición de fragmentos de péptidos de señal inmunorreactivos de EPOsp y/o CNPsp proporciona capacidades de detección y discriminación superiores en comparación con los marcadores estándar existentes. En este sentido, se observa un tiempo mucho más rápido hasta alcanzar los niveles máximos en la sangre y la naturaleza específica de cada marcador por la afección. Con respecto a esto último, se observa también la localización específica en el órgano de cada fragmento de péptido de señal. Así, el EPOsp se libera del riñón, mientras que el CNP se libera del corazón y de los vasos sanguíneos. Además, debido a que los péptidos de señal tienen una vida media más corta en la sangre en comparación con los marcadores existentes, tienen la capacidad de aumentar y disminuir más rápidamente, detectando la enfermedad activa subyacente. Esto no puede decirse de los marcadores existentes, que tienen semividas largas y, por lo tanto, poseen niveles en la sangre que no responden tan rápidamente a la enfermedad activa.

En un aspecto, la invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento biológico en un sujeto en el que el acontecimiento se correlaciona con la liberación de uno o más fragmentos de EPOsp y/o CNPsp en la circulación, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de uno o más de un fragmento de EPOsp y/o CNPsp en una muestra biológica del sujeto y

(b) comparar el nivel de uno o más de un fragmento de EPOsp y/o CNPsp con el nivel de uno o más de un fragmento de EPOsp y/o CNPsp de un fragmento de control,

en el que una desviación en el nivel medido del nivel de control es indicativa de un acontecimiento biológico.

El acontecimiento o trastorno biológico incluye uno o más de una enfermedad o lesión renal aguda y crónica, insuficiencia cardíaca, hipertensión, síncope y enfermedad cardiovascular crónica, enfermedad vascular incluyendo aterosclerosis, placa vulnerable o síndrome o trastorno cardíaco agudo incluyendo infartos de miocardio y angina (inestable) y angina estable.

Los solicitantes también han encontrado sorprendentemente que en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) la concentración circulante de un fragmento de EPOsp y/o CNPsp es más alta en las primeras horas después del inicio de los síntomas del paciente. Los niveles observados en las primeras dos a seis horas, o cuatro horas, fueron

sorprendentemente muy altos alcanzando a menudo un pico de 1,5 a 5, comúnmente dos a tres veces más alto que los niveles en una población de control normal.

En resumen, uno o más de un fragmento de un EPOsp y/o CNPsp son útiles como marcadores claros de etapas tempranas de, por ejemplo, síndromes coronarios agudos (SCA) tales como IAM, particularmente IM sin elevación del segmento ST, e isquemia cardíaca aguda y otros trastornos como se indica en la presente memoria.

Basándose en estas sorprendentes conclusiones, los solicitantes han determinado por primera vez que sería útil analizar una o más de un EPOsp y/o CNPsp o variantes o fragmentos de los mismos en una muestra biológica tomada de un sujeto, particularmente, por ejemplo, doce, diez, ocho, seis, cuatro, dos o una hora desde el inicio de, o a la presentación clínica con el trastorno.

Son útiles en la invención fragmentos o variantes antigénicos de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, los cuales tienen una longitud mínima de 4 o 5 aminoácidos. Los fragmentos particularmente útiles están en el extremo N-terminal (1-9) o en el extremo C-terminal de los péptidos de señal de la presente memoria. Ejemplos de péptidos antigénicos específicos se muestran en las SEQ ID NOS:1-6. Tanto las moléculas de ácido nucleico como los péptidos forman aspectos de la invención.

Los polipéptidos específicos de la invención incluyen un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS:1-6 como se expone aquí. También se contemplan variantes y fragmentos de estos polipéptidos como se definen en la presente memoria, o secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con estos. En una realización, las variantes o fragmentos son variantes o fragmentos funcionalmente equivalentes. Es decir, las variantes o fragmentos mantienen la función como antígenos o péptidos de señal. Cualquiera de los péptidos en las SEQ ID NOS:1-6 se puede usar en la preparación de agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos.

Los polipéptidos, incluyendo polipéptidos variantes y fragmentos, se pueden preparar usando métodos de síntesis de péptidos bien conocidos en la técnica tales como síntesis directa de péptidos usando síntesis en fase sólida o automatizada. También se pueden producir formas mutadas de los polipéptidos utilizando métodos sintéticos tales como mutagénesis específica del sitio del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos.

Los polipéptidos y polipéptidos variantes y fragmentos de los mismos están en una realización aislados. Pueden aislarse o purificarse a partir de fuentes naturales, o después de la síntesis, usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en la técnica. Las tecnologías incluyen HPLC, cromatografía de intercambio iónico e inmunocromatografía pero no se limitan a ellas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome cardíaco agudo en un sujeto, comprendiendo el método: medir el nivel de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento en una muestra biológica de la muestra y comparar el nivel de dichos EPOsp y/o CNPsp o fragmentos con el nivel de un control en el que un nivel medido es superior al nivel de control e indicativo de SCA.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para controlar una respuesta al tratamiento de un SCA o enfermedad renal crónica en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento con el nivel de un control, en el que un cambio en el nivel medido respecto al nivel de control es indicativo de una respuesta al tratamiento.

El lector experto apreciará que para fines de evaluación, el uno o más de un nivel de EPOsp y/o CNPsp o fragmento puede compararse útilmente o correlacionarse con un valor de referencia o valor de control.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un control puede ser un individuo o grupo del que se toman muestras de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento y se determina un nivel medio. Por lo general, el individuo o grupo comprenderá individuos sanos normales o un grupo de individuos que se sabe que no padecen un acontecimiento biológico a ser controlado. Los niveles de fragmentos de EPOsp en individuos normales oscilan entre aproximadamente 14-90 pmol/l (la media es aproximadamente 50 pmol/l). Los niveles de fragmentos de CNPsp en individuos normales oscilan entre aproximadamente 8-50 pmol/l y el nivel de control medio es aproximadamente 21 pmol/l. En otra alternativa, el nivel de control puede evaluarse basándose en una pluralidad de lecturas de individuos o grupos previamente probados.

Se apreciará que la etapa de medir niveles de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos en una muestra puede ser una medición única en una única muestra o mediciones repetidas en varias muestras dependiendo del acontecimiento biológico que está siendo estudiado. En el caso del SCA, la medición puede comprender, por ejemplo, 1 a 20 o más mediciones de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, o 2 o 3 mediciones de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o un fragmento de los mismos en muestras tomadas en momentos diferentes. En una realización, las mediciones se realizan en muestras tomadas en las primeras doce, diez, ocho, seis, cinco, cuatro, dos horas o una hora o menos después del inicio o presentación clínica con un

trastorno o sospecha de trastorno. También pueden hacerse mediciones únicas o repetidas fuera del período de toma de muestras anterior para establecer si el nivel de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos ha caído hasta el nivel de control normal o, por ejemplo, al nivel del control del tejido cardíaco.

En una realización, el método comprende medir niveles de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos en 1 o 2 muestras tomadas en la primera hora de inicio o presentación, seguido por la medición de los niveles de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos en 1 o 2 muestras tomadas dos a cuatro horas, o dos a tres horas desde el inicio o presentación, o medición inicial del nivel de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos.

Como se ha indicado anteriormente, los niveles de uno o más de un fragmento de EPOsp y/o CNPsp de los mismos se miden en la primera a doce, diez, ocho, seis, cuatro o dos horas o menos de inicio o presentación de un SCA, insuficiencia cardíaca o insuficiencia renal, por ejemplo, son de 1,5 a 10, de 1,5 a 5 veces más altos, generalmente de dos a tres veces más altos que los niveles medidos en un control normal.

En una realización, la herramienta de pronóstico, diagnóstico o control se calibra para medir los niveles de uno o más de los péptidos o fragmentos de péptidos correspondientes a cualquiera de las SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 o 6 (o análogos o variantes no humanos de los mismos), u otros fragmentos de péptidos de señal, en el intervalo de, por ejemplo, de 0,1 a 1500 pmol/l, 0,1 a 500 pmol/l, 1 a 300 pmol/l, 10 a 250 o 20 a 150 pmol/l. Además, se pueden encontrar péptidos de señal de eritropoyetina en muestras biológicas, incluidas muestras de plasma, a niveles que oscilan de aproximadamente 400 a 4000 pmol/l, de aproximadamente 400 a 200 pmol/l, de aproximadamente 320 a 520 pmol/l o de aproximadamente 400-420 pmol/l o menos. Son detectables niveles de tan solo 5 pmol/l. Los péptidos de señal de angiotensina pueden encontrarse en muestras biológicas, incluyendo muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 10 a 1000 pmol/l, de aproximadamente 5 a 500 pmol/l, de aproximadamente 1 a 100 pmol/l o de aproximadamente 0,1 a 10 pmol/l o menos. Se pueden detectar niveles de tan solo 0,1 pmol/l. Se pueden encontrar péptidos de señal natriuréticos de tipo C en muestras biológicas, incluyendo muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 50 a 1500 pmol/l, aproximadamente de 25 a 750 pmol/l, de aproximadamente 10 a 500 pmol/l o de aproximadamente 5 a 150 pmol/l o menos. Se detectan niveles de tan solo 2 pmol/l. Los péptidos de señal de endotelina-1 pueden encontrarse en muestras biológicas, incluyendo muestras de plasma, a niveles que varían de aproximadamente 10 a 200 pmol/l, de aproximadamente 5 a 100 pmol/l, de aproximadamente 10 a 50 pmol/l o de aproximadamente 1 a 20 pmol/l o menos. Se detectan niveles de tan solo 1 pmol/l.

En otra realización, un nivel de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos en la muestra en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 250 pmol/l, de aproximadamente 65 a 250 pmol/l, de aproximadamente 65 a 200 pmol/l, de aproximadamente 70 a 150 o de aproximadamente 70 a 130 pmol/l, es indicativo de un SCA.

La muestra biológica como se ha definido anteriormente puede ser cualquier material biológico en el cual uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o fragmento de los mismos puedan ser localizados o secretados. En una realización, una muestra biológica es una muestra biológica de la circulación sanguínea, por ejemplo sangre, suero o plasma. En una realización, la muestra biológica es tejido cardíaco.

Ensayos de ácido nucleico

La presencia de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp y/o fragmento de los mismos y el nivel de expresión en una muestra se pueden determinar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica tales como transferencia Southern, transferencia Northern, FISH o PCR cuantitativa para cuantificar la transcripción del ARNm¹², transferencia de puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente memoria. En una realización, la sonda de hibridación es una sonda marcada. Ejemplos de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioenzimáticos y de biotina-avidina. El marcado y la visualización de las sondas marcadas se lleva a cabo de acuerdo con métodos de la técnica conocidos tales como los anteriores. Por conveniencia, la sonda de ácido nucleico puede inmovilizarse sobre un soporte sólido que incluye resinas (tales como poliacrilamidas), hidratos de carbono (tales como sefarsa), plásticos (tales como policarbonato) y perlas de látex.

El nivel de expresión de ácido nucleico puede determinarse usando técnicas conocidas en la técnica tales como RT-PCR y técnicas de electroforesis incluyendo SDS-PAGE. Utilizando estas técnicas, se amplifica la secuencia de ADN o de ADNc de una molécula de ácido nucleico de la invención, en una muestra en cuestión y se mide el nivel de ADN o ADNc o ARN. En un método alternativo el nivel de ADN, ADNc o ARN puede medirse directamente en la muestra sin amplificación. En una realización, el método es el análisis de hibridación por transferencia Northern.

Como alternativa, el nivel de expresión puede medirse usando ensayos de PCR basados en la transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos para las secuencias de ácido nucleico. Si se desea, la comparación del nivel de uno o más de un polinucleótido de EPOsp y/o CNPsp en la muestra puede hacerse con referencia a una molécula de ácido nucleico de control cuya expresión es independiente del parámetro o afección que se está

mediendo. Una molécula de ácido nucleico de control se refiere a una molécula en la cual el nivel no difiere entre el trastorno o el estado de rechazo del trasplante y el estado saludable. Los niveles de la molécula de control se pueden utilizar para normalizar los niveles en las poblaciones comparadas. Un ejemplo de dicha molécula de control es GAP-DH. Los polipéptidos y fragmentos de EPOsp y/o CNPsp de la invención cambiarán los niveles con el acontecimiento o trastorno biológico.

Ensayos de péptidos

En una realización, la etapa de medición comprende detectar la unión entre uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos y un agente de unión que se une, por ejemplo, selectiva o específicamente, a uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o un fragmento o variante de los mismos.

De acuerdo con esto, en una realización la invención proporciona un ensayo para uno o más de un EPOsp y/o CNPsp o un fragmento o variante de los mismos en una muestra biológica, comprendiendo el ensayo detectar y medir el nivel de los mismos en la muestra usando cualquier método conocido. En una realización, la muestra biológica se obtiene de un sujeto aproximadamente doce, diez, ocho, seis o cuatro o menos horas desde el inicio de un SCA u otro trastorno relacionado con la concentración o cantidad de dicho fragmento(s) en una muestra biológica, o doce, diez, ocho, seis o cuatro o menos horas desde la presentación clínica con un SCA, por ejemplo, y se mide un EPOsp y/o CNPsp o un fragmento de los mismos.

En una realización, la invención proporciona un ensayo para uno o más de un EPOsp y/o CNPsp y/o fragmentos de los mismos que comprende:

- (a) la unión de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp y/o o un fragmento de los mismos a partir de una muestra biológica; y
- (b) medir el nivel de EPOsp y/o CNPsp o un fragmento o fragmento de los mismos, péptidos o fragmentos.

En una realización, la molécula diana es una o más de las SEQ ID NOS:1-6 o una variante o fragmento de la misma.

En una realización, uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos se une usando un agente de unión. El agente de unión puede ser un agente de unión selectivo (específico). Es decir, tiene baja reactividad cruzada con otros marcadores de acontecimientos biológicos, y más particularmente grelina. El agente de unión en una realización es un anticuerpo o una molécula que comprende un fragmento de unión al antígeno del mismo. Cuando se utiliza un anticuerpo en el ensayo, el anticuerpo puede obtenerse contra cualquier parte antigénica de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, incluido dentro del extremo N terminal o del extremo C terminal, siempre y cuando se una a un fragmento encontrado en una muestra biológica, preferiblemente una muestra en la cual su presencia indica excreción de una célula. En una realización, el anticuerpo se obtiene contra un péptido de acuerdo con una o más de las SEQ ID NOS:1-6 o una variante o fragmento de los mismos.

La presente invención también se refiere a agentes de unión, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos y sus usos. Los usos proporcionados incluyen un ensayo, o en la fabricación de un ensayo, o como una herramienta pronóstica, diagnóstica o de control como se describe en la presente memoria, como son kits relacionados con instrucciones de uso.

Los agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos, pueden estar en forma aislada o purificada. Un anticuerpo que se une a uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento o variante de los mismos puede estar en cualquier forma, incluyendo, por ejemplo, todas las clases de anticuerpos policlonales, monoclonales, de cadena sencilla, humanos, humanizados y quiméricos y otras construcciones de unión al antígeno. También se incluye un antisuero obtenido mediante inmunización de un animal tal como un ratón, rata o conejo. Los anticuerpos pueden unirse a una secuencia común en un grupo de fragmentos, o a un fragmento específico de EPOsp y/o CNPsp, o incluso a conjuntos de fragmentos.

Se puede usar un fragmento de un anticuerpo o un anticuerpo modificado siempre que se una al péptido de señal deseado o a un fragmento o variante del mismo. El fragmento de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, Fab, F(ab'), F(ab') un fragmento Fv o Fv de cadena sencilla (scFv), en el cual los fragmentos Fv de las cadenas H y L se ligan mediante un enlazador apropiado.¹³

Los métodos para preparar anticuerpos, y su detección, modificación y aislamiento son bien conocidos en la técnica.^{14,11,16} En una realización, los anticuerpos utilizados se producen por inmunización de un mamífero hospedador adecuado. También pueden usarse como inmunógenos proteínas de fusión que comprenden uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos.

Un agente de unión, tal como un anticuerpo u otra molécula que comprende un sitio de unión al antígeno, puede ser modificado por conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), biotina, estreptavidina y marcadores quimioluminiscentes, fluorescentes, calorimétricos y radioinmunoquímicos como se describe en la presente memoria. El anticuerpo modificado se puede obtener modificando químicamente un anticuerpo. Estos

métodos de modificación son convencionales en el campo.

En resumen, los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Generalmente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una o más de un EPOsp y/o un CNPsp, o un fragmento o variante de los mismos o una proteína de fusión de los mismos. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se va a inmunizar. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, albúmina de suero bovino, tiroglobulina bovina e inhibidor de la tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin experimentación indebida.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma bien conocidos en la materia. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado, como alternativa, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del American Type Culture Collection, Virginia, EE.UU. Pueden usarse inmunoensayos para detectar líneas celulares inmortalizadas que secretan el anticuerpo de interés. En la detección pueden usarse uno o más de un EPOsp y/o CNPsp.

Por consiguiente, también se contemplan en la presente memoria hibridomas que son líneas celulares inmortalizadas capaces de secretar un anticuerpo monoclonal específico de un fragmento de EPOsp y/o CNPsp.

Los medios bien conocidos para establecer la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma incluyen inmunoprecipitación, inmunoensayo ligado a enzimas (RIA), ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) y transferencia Western. Por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis de Scatchard.¹⁴ Las muestras de animales inmunizados pueden cribarse de forma similar para determinar la presencia de anticuerpos policlonales.

También pueden obtenerse anticuerpos monoclonales y otras construcciones de unión al antígeno a partir de células hospedadoras recombinantes. El ADN que codifica el anticuerpo o la construcción de unión al antígeno puede obtenerse a partir de una línea celular de hibridoma. El ADN se coloca después en un vector de expresión, transfectado en células hospedadoras (por. ej., células COS, células CHO, células de *E. Coli*) y el anticuerpo o la construcción de unión al antígeno producida en las células hospedadoras. El anticuerpo se puede aislar y/o purificar usando técnicas estándar.

Para facilitar la detección, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención pueden marcarse con marcadores detectables tales como, por ejemplo, compuestos fluorescentes, bioluminiscentes y quimioluminiscentes, así como radioisótopos, perlas magnéticas y marcadores de afinidad (por ej., biotina y avidina). Ejemplos de marcadores que permiten la medición indirecta de la unión incluyen enzimas en las que el sustrato puede proporcionar un producto fluorescente coloreado, las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa y similares. Los fluorocromos (p.ej, Texas rojo, fluoresceína, ficobiliproteínas y ficoeritrina) pueden usarse con un clasificador de células activado por fluorescencia. Las técnicas de marcado son bien conocidas en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, secretados por las células pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, HPLC de fase inversa, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

La unión de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, puede detectarse por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo métodos específicos (basados en anticuerpos) y no específicos (tales como HPLC en fase sólida). Más comúnmente, los anticuerpos se detectan usando un ensayo tal como ELISA o RIA como se ha indicado anteriormente. Son también factibles los ensayos de unión competitiva, los ensayos en sándwich, los ensayos no competitivos, el fluoroinmunoensayo, el ensayo inmunofluorométrico o los ensayos inmunoradiométricos, los ensayos de luminiscencia, los ensayos de quimioluminiscencia y los análisis de espectrometría de masas tales como la ionización de desorción por láser inducida en superficie (SELDI), la ionización por electronebulización (ESI), la ionización de desorción por láser asistida por matriz (MALDI), la espectroscopía de masas por resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier (FTICR) solos o en combinación con agentes de unión no específicos tales como formatos de cromatografía.

Convenientemente, un anticuerpo puede fijarse a un sustrato sólido para facilitar el lavado y el aislamiento del complejo polipéptido/anticuerpo. La unión de anticuerpos a un soporte sólido se puede conseguir usando técnicas conocidas. Los sustratos sólidos útiles para anticuerpos incluyen vidrio, nylon, papel y plástico. De forma similar, uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, pueden ser adsorbidos sobre un sustrato sólido tal

como sílice adsorbente, o partículas de resina o chips de silicio opcionalmente recubiertos o derivatizados con intercambio iónico, fase inversa (por ej., revestimiento C18) u otros materiales. El sustrato puede estar en forma de perlas, placas, tubos, barras o biochips. Ejemplos de biochips incluyen Ciphergen, matrices ProteinChip (Ciphergen Biosystems (CA, EE.UU.)) y Packard BioChips disponible en Perkin Elmer, EE.UU. Los biochips pueden incluir una superficie cromatográfica. Los biochips o placas con posiciones direccionables y placas discretas de microtitulación son particularmente útiles. También se prefieren para su uso sistemas multiplexados en los que se utilizan perlas que contienen anticuerpos dirigidos a múltiples analitos para medir los niveles de los analitos en una única muestra. Los analitos a medir pueden incluir otros marcadores, por ej., marcadores cardíacos, así como un EPOsp y/o CNPsp, o variantes o fragmentos de los mismos. Un ejemplo de un sistema multiplexado basado en perlas adecuado para su uso en la presente invención es el sistema Luminex Fluorokine Multianalyte Profiling. Los métodos de ensayo de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo los documentos US 5.221.685, US 5.310.687, US 5.480.792, US 5.525.524, US 5.679.526, US 5.824.799, US 5.851.776, US 5.885.527, US 5.922.615, US 5.939.272, US 5.647.124, US 5.985.579, US 6.019.944, US 6.113.855, US 6.143.576 y para ensayos no marcados US 5.955.377 y US 5.631.171.

Los analizadores de inmunoensayo son también bien conocidos e incluyen sistemas Beckman Access, Abbott AxSym, Roche ElecSys/Cobas y Dade Behring Status entre otros que están bien descritos. La unión de uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos y un anticuerpo para formar un complejo puede detectarse directa o indirectamente. La detección directa se lleva a cabo usando marcadores tales como fluorescencia, luminiscencia, radionucleidos, metales, colorantes y similares. La detección indirecta incluye marcadores detectables de unión tales como digoxina o enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina para formar un anticuerpo marcado seguido por una etapa de detección del marcador por adición de reactivos de detección.

La peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, puede incubarse con sustratos tales como dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) y peróxido para generar un producto coloreado cuya absorbancia puede medirse o con luminol y peróxido para dar luz quimioluminiscente que se puede medir en un luminómetro como se conoce en la técnica. La biotina o la digoxina pueden hacerse reaccionar con agentes de unión que se unen fuertemente a ellos. Por ejemplo, las proteínas avidina y estreptavidina se unirán fuertemente a la biotina. A continuación, un marcador mensurable adicional se une o se enlaza covalentemente a ellos ya sea por reacción directa con la proteína, o mediante el uso de agentes reticulantes comúnmente disponibles tales como MCS y carbodiimida, o por adición de agentes quelantes.

Generalmente, el complejo se separa de los reactivos que no han formado complejos, por ejemplo, por centrifugación. Si el anticuerpo está marcado, la cantidad de complejo se reflejará por la cantidad de marcador detectado. Como alternativa, uno o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, pueden marcarse por unión a un anticuerpo y detectarse en un ensayo competitivo midiendo una reducción en el polipéptido marcado unido cuando el polipéptido marcado con anticuerpo se incubaba con una muestra biológica que contiene una o más de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos que no está marcado. Pueden usarse otros inmunoensayos, por ejemplo, un ensayo en sándwich.

En una realización, después del contacto con el anticuerpo, generalmente durante una noche durante 18 a 25 horas a 4 °C, o durante 1 a 2 a 4 horas entre 25 °C y 40 °C, el EPOsp y/o CNPsp marcado o un fragmento de los mismos unidos al agente de unión (anticuerpo) se separa del EPOsp y/o CNPsp marcados no unidos, o un fragmento de los mismos. En los ensayos en fase de disolución, la separación puede realizarse mediante la adición de un anticuerpo anti-gammaglobulina (segundo anticuerpo) acoplado a partículas en fase sólida tales como celulosa o material magnético. El segundo anticuerpo se obtiene en una especie diferente a la utilizada para el anticuerpo primario y se une al anticuerpo primario. Por lo tanto, todos los anticuerpos primarios están unidos a la fase sólida a través del segundo anticuerpo. Este complejo se separa de la solución por centrifugación o atracción magnética y el péptido marcado unido se mide usando el marcador unido a él. Otras opciones para separar el marcador unido del libre incluyen la formación de complejos inmunitarios, que precipitan de la solución, la precipitación de los anticuerpos por polietilenglicol o la unión del péptido marcado libre a carbón vegetal y extracción de la solución por centrifugación de filtración. El marcador en la fase unida o libre separada se mide por un método apropiado tal como los presentados anteriormente.

Los ensayos de unión competitiva también pueden configurarse como ensayos en fase sólida que son más fáciles de realizar y por lo tanto son preferibles a los anteriores. Este tipo de ensayo utiliza placas con pocillos (comúnmente conocidos como ELISA o placas de inmunoensayo), perlas sólidas o superficies de tubos. El anticuerpo primario está adsorbido o unido covalentemente a la superficie de la placa, perla o tubo, o está unido indirectamente a través de un segundo anticuerpo anti-gammaglobulina o anticuerpo anti-región Fc adsorbido o unido covalentemente a la placa. La muestra y el péptido marcado (como anteriormente) se añaden a la placa conjuntamente o secuencialmente y se incuban en condiciones que permiten la competencia para la unión del anticuerpo entre un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos en la muestra y el péptido marcado. El péptido marcado no unido puede ser aspirado posteriormente y la placa enjuagada dejando el péptido marcado unido al anticuerpo unido a la placa. El péptido marcado se puede medir a continuación usando las técnicas descritas anteriormente.

Los ensayos en sándwich tienen mayor especificidad, velocidad y mayor rango de medición. En este tipo de ensayo, un exceso del anticuerpo primario anti-EPOsp y/o anti-CNPsp, o un fragmento de los mismos, se une al pocillo de una placa, perla o tubo de ELISA mediante adsorción, acoplamiento covalente o un anticuerpo anti-Fc o gammaglobulina, como se ha descrito anteriormente para ensayos de unión por competición en fase sólida. El líquido o extracto de muestra se pone en contacto con el anticuerpo unido a la fase sólida. Debido a que el anticuerpo está en exceso, esta reacción de unión es habitualmente rápida. También se incubaba un segundo anticuerpo a un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, con la muestra, simultánea o secuencialmente con el anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo se elige para unirse a un sitio en un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos que es diferente del sitio de unión del anticuerpo primario. Estas dos reacciones de anticuerpo dan como resultado un sándwich con el EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos de la muestra intercalada entre los dos anticuerpos. El segundo anticuerpo se marca habitualmente con un compuesto fácilmente medible como se ha detallado anteriormente para ensayos de unión competitiva. Como alternativa, se puede poner en contacto un tercer anticuerpo marcado que se une específicamente al segundo anticuerpo con la muestra. Después de lavar el material no unido, el anticuerpo marcado unido se puede medir y cuantificar mediante los procedimientos esbozados para ensayos de unión competitiva.

También se puede usar un ensayo de tipo tira reactiva. Estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Pueden, por ejemplo, emplear partículas pequeñas tales como partículas de látex doradas o coloreadas con anticuerpos específicos unidos. La muestra líquida a medir puede añadirse a un extremo de una membrana o tira de papel precargada con las partículas y permitir la migración a lo largo de la tira. La unión del antígeno en la muestra a las partículas modifica la capacidad de las partículas para unirse a sitios de captura, que contienen agentes de unión para las partículas tales como antígenos o anticuerpos, además a lo largo de la tira. La acumulación de las partículas coloreadas en estos sitios produce el desarrollo del color dependiendo de la concentración del antígeno competidor en la muestra. Otros métodos de tira reactiva pueden emplear anticuerpos unidos covalentemente a papel o tiras de membrana para atrapar el antígeno en la muestra. Las reacciones subsiguientes que emplean segundos anticuerpos acoplados a enzimas tales como peroxidasa de rábano picante e incubación con sustratos para producir la emisión de color, fluorescente o quimioluminiscente permitirán la cuantificación del antígeno en la muestra.

Como se describe en los siguientes ejemplos, en una realización el radioinmunoensayo (RIA) es la técnica de laboratorio utilizada. En un RIA se emplea un antígeno radiomarcado y un antígeno no marcado en unión competitiva con un anticuerpo. Los radiomarcadores comunes incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C .

Los radioinmunoensayos que implican la precipitación de un EPOsp y/o CNPsp o un fragmento de los mismos con un anticuerpo específico y una proteína de unión a anticuerpo radiomarcado pueden medir la cantidad de anticuerpo marcado en el precipitado como proporcional a la cantidad de un EPOsp y/o CNPsp o un fragmento en la muestra. Como alternativa, se produce un EPOsp y/o CNPsp marcado o un fragmento de los mismos y se usa una proteína de unión a anticuerpo no marcado. A continuación se añade una muestra biológica a ensayar. La disminución de los recuentos de los EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, marcados es proporcional a la cantidad de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos en la muestra.

En el RIA también es factible separar un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, unidos de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento de los mismos, libres. Esto puede implicar precipitar el complejo péptido/anticuerpo con un segundo anticuerpo. Por ejemplo, si el complejo péptido/anticuerpo contiene anticuerpo de conejo, entonces puede usarse anticuerpo anti-conejo de burro para precipitar el complejo y la cantidad de marcador contada. Por ejemplo en un contador LKB, contador Gammamaster.⁹

Los métodos de la invención comprenden además medir los niveles de uno o más de otros marcadores de enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, etc. El nivel del otro marcador o marcadores puede compararse con los niveles medios de control de una población de control. Una desviación en el nivel medido del nivel respecto al control medio es predictiva o diagnóstica de o una predisposición a enfermedad renal aguda o crónica, enfermedad cardiovascular aguda o crónica, etc.

Los métodos de la invención se han descrito con respecto a un nivel más alto o a un aumento en los niveles de un EPOsp y/o un CNPsp, o fragmento de los mismos, que es indicativo de síndromes coronarios agudos (por ej., IAM y angina), insuficiencia cardíaca, enfermedad vascular incluyendo aterosclerosis y enfermedad renal crónica. También se contemplan las desviaciones de medida por encima o por debajo de un nivel de control.

Otros marcadores incluyen troponina T, troponina I, creatin quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP, BNP-SP, ANP, ANP-SP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina y angiotensina II. Estos marcadores están todos implicados en la disfunción o enfermedad cardíaca. Los kits y los reactivos para llevar a cabo tales ensayos están disponibles comercialmente de varios proveedores. La correlación entre el nivel de un EPOsp y/o CNPsp, o fragmento de los mismos con otros marcadores, puede aumentar el valor predictivo, de diagnóstico o de control de un EPOsp y/o CNPsp, o fragmento de los mismos. En el caso del SCA, la combinación de los niveles de marcador de un EPOsp y/o CNPsp, o fragmentos, con marcadores cardíacos conocidos puede aumentar el valor predictivo o diagnóstico de un resultado de paciente.

El análisis de un varios marcadores peptídicos puede llevarse a cabo simultánea o separadamente usando una sola muestra de ensayo. Se prefieren ensayos de formato simultáneo, de dos o múltiples sitios. Especialmente útiles son los sistemas multiplex basados en perlas, microensayo o biochip. Las perlas, ensayos o chips pueden tener una serie de posiciones discretas, a menudo direccionables, que comprenden un anticuerpo para uno o más marcadores incluyendo un EPOsp y/o CNPsp, o fragmento de los mismos. El uno o más marcadores incluyen más de un EPOsp y/o CNPsp, o fragmento marcador de los mismos. Por ejemplo, puede ser útil analizar EPOsp y/o CNPsp N-terminal y C-terminal, o fragmentos de los mismos y combinar los resultados del ensayo. Muchas otras combinaciones de marcadores son factibles. El documento US2005/0064511 y US 6.019.944 proporciona una descripción de micromatrices, chips, dispositivos capilares y técnicas útiles en la presente invención. Luminex proporciona un sistema multiplex basado en perlas útil en la presente invención. Los analizadores de laboratorio adecuados para usar con ensayos separados o secuenciales incluyen el sistema de inmunoensayo AxSym (Abbott, EE.UU.), ElecSys (Roche), Access (Beckman), ADVIA CENTAUR® (Bayer) y Nichols Advantage® (Nichols Institute).

En una realización, los ensayos simultáneos de una pluralidad de polipéptidos se realizan sobre una única superficie tal como un chip o matriz.

En otra realización se llevan a cabo ensayos separados de uno o más marcadores no EPOsp y/o no CNPsp, o fragmentos de los mismos, y los resultados se reúnen o combinan con EPOsp y/o CNPsp, o resultados de un marcador del fragmento.

Cuando se va a controlar un sujeto, se pueden tomar varias muestras biológicas a lo largo del tiempo. El muestreo en serie permite que los cambios en los niveles de los marcadores se midan con el tiempo. El muestreo puede proporcionar información sobre el tiempo aproximado de inicio de un acontecimiento, la gravedad del acontecimiento, indicar qué regímenes terapéuticos pueden ser apropiados, la respuesta a los regímenes terapéuticos empleados o el pronóstico a largo plazo. El análisis se puede realizar en los puntos de atención, como en las ambulancias, consultorios médicos, en la presentación clínica, durante las estancias en el hospital, en pacientes ambulatorios, o durante las pruebas de detección rutinarias, etc.

Los métodos de la invención también pueden realizarse conjuntamente con un análisis de uno o más factores de riesgo tales como, pero sin limitarse a edad, peso, nivel de actividad física, sexo y antecedentes familiares de acontecimientos tales como obesidad, diabetes y acontecimientos cardíacos. Los resultados de la prueba también pueden usarse conjuntamente con los métodos de la invención. Por ejemplo, pruebas de tolerancia a la glucosa, resultados del ECG y examen clínico. Se puede utilizar un cambio estadísticamente significativo en el nivel circulante de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento del mismo, junto con uno o más factores de riesgo adicionales o los resultados de prueba para diagnosticar, pronosticar o controlar con más precisión la afección del sujeto.

Síndromes cardíacos agudos

Los solicitantes han mostrado que las concentraciones de diversos fragmentos de péptidos de señal están correlacionadas con trastornos cardíacos agudos (Figura 6). Por otra parte, los niveles de un EPOsp y/o CNPsp, o fragmento(s) de los mismos, están en su máximo en la presentación clínica en el caso de pacientes que presentan sospecha de infarto agudo de miocardio (IAM) o ataque al corazón. Los pacientes que presentan síndromes o trastornos cardíacos agudos y en particular isquemia cardíaca aguda, arteriopatía coronaria causada por (ataque al corazón que deja cicatrices en el músculo cardíaco o miocardio) pueden o no experimentar un infarto de miocardio (IM) posterior. El grupo que no sufre IM no puede diagnosticarse fácilmente usando técnicas clínicas y marcadores actuales. Los solicitantes han proporcionado un marcador temprano y específico útil para el daño miocárdico asociado, por ejemplo, con IM. Esto permitirá el diagnóstico precoz del daño miocárdico debido a acontecimientos adversos y permitirá a un médico distinguir tales casos de otros síndromes coronarios agudos, incluyendo angina, así como de otras causas de dolor torácico (por ejemplo, enfermedad gastrointestinal, trastornos del pulmón/pleurales y similares). Esto acorta significativamente la ventana que actualmente existe de espera para la elevación de los niveles de biomarcadores cardíacos actuales tales como mioglobina, CK-MB, TnT y Tnl. Un diagnóstico y un tratamiento más precisos también pueden realizarse antes, reduciendo la morbilidad y la mortalidad y proporcionando mejores resultados pronósticos.

En otra realización, la invención tiene aplicación en el control del tratamiento de reperusión en pacientes cardíacos. El tratamiento de reperusión incluye comúnmente la intervención coronaria percutánea (por ejemplo, angioplastia) y/o tratamiento farmacológico. Los fármacos trombolíticos para la revascularización se emplean comúnmente en el tratamiento farmacológico. Las terapias complementarias incluyen tratamientos anticoagulantes y antiplaquetarios. El tratamiento con reperusión es más eficaz cuando se emplea tan pronto como sea posible después del diagnóstico. El uso de análisis de EPOsp y/o CNPsp, o fragmento(s) de los mismos, para acelerar el diagnóstico permite la introducción inmediata del tratamiento de reperusión. La eficacia del tratamiento también puede controlarse mediante pruebas repetidas, y la terapia se ajusta según sea apropiado. Para una discusión detallada del tratamiento de reperusión véase lo descrito en Braunwald et al.³

Enfermedad cardíaca

Los métodos de la invención también pueden ser útiles para diagnosticar o predecir la enfermedad cardíaca en un sujeto por análisis de un EPOsp y/o CNPsp, o fragmentos de los mismos, particularmente en muestras biológicas extraídas de la circulación (o muestras biológicas derivadas de tales muestras).

Dopaje en la sangre

Aplicado al espectro de agentes que los atletas pueden elegir para reforzar ilegalmente el rendimiento, las proteínas y los péptidos proporcionan una opción atractiva. En un aspecto, la invención proporciona una solución a este problema. Cuando se producen mediante tecnologías sintéticas o recombinantes, se producen proteínas tales como EPO para imitar lo más posible la contraparte endógena presente en la circulación o tejido. Esto implica la eliminación a priori o a posteriori de los componentes que harían la molécula vulnerable a la fácil detección. Uno de estos componentes es una región de la molécula conocida como péptido de señal. Se pensó que las secuencias de péptidos de señal derivadas de la producción endógena de proteínas sufrían destrucción intracelular y, por tanto, estaban ausentes de la circulación. Sin embargo, hemos desarrollado nuevas tecnologías de inmunoensayo para demostrar que las secuencias de péptidos de señal de la EPO no solo están presentes en la circulación de los seres humanos, sino que también pueden medirse en la orina (u otro líquido corporal, muestra de tejido, etc.). La secuencia del péptido de señal de la EPO es muy corta en comparación con la EPO natural o recombinante de longitud completa y tiene una estructura primaria y terciaria mucho más sencilla, sin glicosilaciones, lo que la hace mucho más fácil de medir mediante los formatos de ensayo existentes. En la presente memoria se describe un inmunoensayo dirigido al péptido de señal de la EPO humana, que es sensible para el péptido de señal de la EPO (EPOsp) humana inmunorreactivo y puede detectar niveles circulantes hasta <20 fmol/ml (<640 pg/ml). Utilizando este ensayo, hemos determinado en plasma humano normal, una relación de EPOsp:EPO de aproximadamente 6:1. Sin embargo, en pacientes con insuficiencia renal crónica esta proporción se eleva a aproximadamente 10:1, mientras que en pacientes con insuficiencia cardíaca la relación es aproximadamente 3:1. Por lo tanto, existe una respuesta diferencial de la relación EPOsp:EPO en pacientes con diferentes estados patológicos. Aplicando este paradigma a los deportistas que se dopan con o que usan de otra manera la EPO recombinante, se podría esperar que la relación EPOsp:EPO en el plasma sea menor que 1:1, incluyendo 1:10, 1:100, 1:1000 o menos durante, por ejemplo, la fase aguda de administración. Después de la administración repetida de rEPO, los niveles circulantes de EPOsp serán mucho más bajos que los niveles normales sin fármaco, debido a cambios en la secreción endógena y la excreción. Además, como el EPOsp es una molécula mucho más pequeña que la propia EPO, su eliminación renal y su presencia urinaria posterior mostrarán una marcada variación con prominentes oscilaciones en la relación en comparación con el EPOsp plasmático.

Kits

Por lo general, los kits se formatearán para ensayos conocidos en la técnica, y en ciertas realizaciones para ensayos RIA o ELISA, como se conocen en la técnica.

Los kits también pueden incluir uno o más marcadores adicionales para los trastornos señalados en la presente memoria. En el caso del SCA, por ejemplo, el marcador adicional puede incluir uno o más de troponina T, troponina I, creatin quinasa MB, mioglobina, ANP, BNP, BNP-SP, ANP, ANP-SP, NT-BNP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina y angiotensina II. En una realización, todos los subconjuntos de los marcadores están incluidos en el kit.

El kit puede estar compuesto por uno o más envases y también puede incluir equipo de recogida, por ejemplo, de frascos, bolsas (tales como bolsas de líquidos intravenosos), viales, jeringas y tubos de ensayo. Se incluirá al menos un envase y contendrá un producto que sea eficaz para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento biológico tal como enfermedad renal aguda o crónica, enfermedad cardiovascular aguda o crónica, SCA, etc. El producto es habitualmente un polipéptido y/o un agente de unión, particularmente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención, o una composición que comprende cualquiera de estos. En una realización preferida, una instrucción o marcador en o asociado con el envase indica que la composición se utiliza para predecir, diagnosticar o controlar el acontecimiento biológico. Otros componentes pueden incluir agujas, diluyentes y tampones. Útilmente, el kit puede incluir al menos un envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Los agentes de unión que se unen selectivamente a EPOsp y/o CNPsp, o fragmento(s) de los mismos, se incluyen deseablemente en el kit. En una realización, el agente de unión es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención. El anticuerpo usado en los ensayos y kits puede ser monoclonal o policlonal, por ejemplo, y puede prepararse en cualquier mamífero como se ha discutido anteriormente, e incluye fragmentos de anticuerpos y anticuerpos preparados usando, por ejemplo, péptidos nativos y de fusión.

En una realización de kit, un reactivo de detección de péptidos diana se inmoviliza sobre una matriz sólida, por ejemplo, una tira o chip poroso para formar al menos un sitio de detección de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento(s) de los mismos. La región de medición o detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de

sitios de detección, tales sitios de detección contienen un reactivo de detección. Los sitios pueden estar dispuestos en una barra, cruz o punto u otra disposición. Una tira o chip de ensayo también puede contener sitios para controles negativos y/o positivos. Los sitios de control pueden alternativamente estar en una tira o chip diferente. Los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos o anticuerpos inmovilizados, por ej., una cantidad mayor en el primer sitio de detección y menores cantidades en sitios subsiguientes. Tras la adición de una muestra biológica de ensayo, el número de sitios que muestran una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad de un EPOsp y/o CNPsp, o un fragmento(s) de los mismos presentes en la muestra.

También se puede incluir en el kit un dispositivo para el análisis de muestras que comprende un cartucho de ensayo desechable con componentes apropiados (marcadores, anticuerpos y reactivos) para llevar a cabo el análisis de la muestra. El dispositivo incluirá convenientemente una zona de análisis y una ventana con los resultados de la prueba. Los cartuchos inmunocromatográficos son ejemplos de tales dispositivos. Ver por ejemplo los documentos US 6.399.398; US 6.235.241 y US 5.504.013.

Como alternativa, el dispositivo puede ser un dispositivo electrónico que permita la entrada, el almacenamiento y la evaluación de niveles del marcador medido frente a niveles de control y otros niveles de marcador. El documento US 2006/0234315 proporciona ejemplos de tales dispositivos. También son útiles en la invención el Protein Chip® de CIPHERGEN que puede usarse para procesar los resultados del ensayo SELDI usando el paquete de software Protein Chip® de CIPHERGEN.

En esta memoria descriptiva cuando se hace referencia a especificaciones de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto tiene por objeto, en general, proporcionar un contexto para discutir las características de la invención. A menos que se especifique lo contrario, la referencia a tales documentos externos no debe interpretarse como un reconocimiento de que dichos documentos o tales fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnicas anteriores o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

La invención se ilustrará ahora de manera no limitativa haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

MÉTODOS

Todos los protocolos humanos fueron aprobados por el Comité de Ética Regional (Upper South) del Ministerio de Sanidad de Nueva Zelanda y se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Sustancias químicas

Se sintetizaron fragmentos de péptidos de señal humanos sintéticos correspondientes a EPOsp y CNPsp utilizando un método de síntesis de fase sólida Fmoc en condiciones suaves.^{4,9} Todos los reactivos tampón se adquirieron en BDH® (Reino Unido) y/o Sigma (Mo, EE.UU.). EPOsp (1-9) y CNPsp (14-23) se sintetizaron con una cisteína extendida (extremo C terminal o N terminal) para acoplamiento direccional del vehículo. También se sintetizaron EPOsp (1-9) y CNPsp (14-23), péptidos que contienen tirosilo para la preparación del trazador.

Estudios en humanos

Se recogieron muestras de sangre sin ayuno de los siguientes grupos de pacientes que se presentaban en Christchurch Hospital, Nueva Zelanda:

1) *55 voluntarios sanos, normales*. Las muestras se recogieron en tubos de sangre de EDTA, se centrifugaron y el plasma se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

2) *10 pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) aguda descompensada*. Las muestras se tomaron en la presentación, 24-48 horas después del ingreso al alta hospitalaria.

3) *23 pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IMEST)*. Las muestras se extrajeron al ingreso en la Unidad de Cuidados Coronarios (tiempo 0) y después a las 00,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 72 horas como pacientes ingresados, las muestras se tomaron en tubos en hielo y se centrifugaron a +4 °C a 2700 g durante 5 min y el plasma se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

4) *75 pacientes con enfermedad renal terminal*. Las muestras se extrajeron en tubos de recolección de EDTA en una visita ambulatoria al hospital, se centrifugaron para preparar plasma y se almacenaron a -80 °C.

Extracción de plasma

Todas las muestras de plasma se extrajeron en los cartuchos SepPak (Waters, EE.UU.) como se describió anteriormente⁹, se secaron y se almacenaron -20 °C antes del RIA y la HPLC.

Análisis de la concentración hormonal

Se analizaron muestras de plasma para Tn1, CK-MB, mioglobina e insulina usando inmunoensayos heterólogos en un Elecsys 2010 (Roche, EE.UU.) usando anticuerpos biotinilados marcados con rutenio de acuerdo con los protocolos de los fabricantes estándar.

Los fragmentos de EPOsp y CNPsp se midieron mediante RIA específico como sigue:

RIA de EPOsp (1-9) y CNPsp (14-23)

Para la medición de los péptidos EPOsp (1-9) y CNPsp (14-23) humanos circulantes, se generaron nuevos inmunoensayos específicos.

Generación de anticuerpos

Cada secuencia de residuos antigénica, que contenía una cisteína unida al extremo N terminal o C terminal, se acopló a BSA derivatizada de éster N-e-maleimidocaproiloxi-succinimida tratado con maleimida (EMCS) en PBS (pH 7,0) mezclando suavemente a temperatura ambiente. El péptido acoplado se emulsionó con adyuvante de Freund (2 ml) y se inyectó subcutáneamente (2 ml en total) en 2 ovejas en 4-5 sitios a intervalos mensuales. Las ovejas fueron sangradas 12 días después de la inyección para evaluar los títulos de anticuerpos hasta alcanzar niveles adecuados. Para el inmunoensayo, la inmunorreactividad de EPOsp y CNPsp se determinó usando antisero dentro del intervalo de dilución final de 1: 6.000-1: 45.000. Cada antisero no tenía reactividad cruzada detectable con los péptidos y fármacos indicados en la Figura 6, incluyendo proBNP humano (1-13), proBNP (1-76), proANP (1-30), insulina, angiotensina II, angiotensina (1-7), urotensina II, CNP, grelina, C-grelina (52-117), proCNP (1-15), adrenomedulina, urocortina I, urocortina II, BNP-SPn (1-10), ANP-SPc (16-25) ANP-SP (1-10), INS-SPn (1-9). La reactividad cruzada se evaluó siguiendo protocolos estandarizados bien conocidos en la técnica.¹⁰

Método de yodación y ensayo

Cada residuo antigénico, que contenía un residuo de tirosina en el extremo N terminal o C terminal, se yodó mediante el método de cloramina T y se purificó en HPLC de fase inversa (RP-HPLC). A partir de esta preparación se probó una forma de trazador yodado después de la RP-HPLC. Todas las muestras, patrones, trazas radiactivas y soluciones de antisero se diluyeron en tampón de ensayo basado en potasio.^{4,9} Cada incubación de ensayo consistió en 100 µl de muestra o patrón (la secuencia de péptido antigénica sintética apropiada) y 100 µl de antígeno - antisero específico que se agitó en vórtex e incubó a 4 °C durante 24 horas. Se añadieron a continuación 100 µl de traza (4000-5000 cpm) y se incubaron adicionalmente durante 24 horas más a 4 °C. Las inmunorreactividades libres y unidas se separaron finalmente mediante el método de segundo anticuerpo en fase sólida (anti-oveja de burro Sac-Cel®, IDS Ltd, Inglaterra) y se contaron en un contador Gammamaster (LKB, Uppsala, Suecia).

Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como media ± EEM. Los datos de la evolución temporal se analizaron utilizando ANOVA bidireccional para mediciones repetidas seguidas de la prueba de la diferencia menos significativa *post-hoc*. El análisis de correlación de las concentraciones de hormonas plasmáticas se llevó a cabo utilizando un modelo de regresión lineal general. En todos los análisis, se consideró significativo un valor de P <0,05.

RESULTADOS

Las concentraciones plasmáticas venosas respectivas (en pmol/l) medidas para los fragmentos de EPOsp y CNPsp en seres humanos sanos están por debajo de:

Fragmento de EPOsp	49,9 ± 3,7
Fragmento de CNPsp	20,7 ± 3,1

En seres humanos sanos, las concentraciones de EPOsp y CNPsp en la sangre no muestran una correlación significativa con el IMC. Habiendo establecido que los fragmentos de EPOsp y CNPsp están presentes en el plasma humano, se midieron las concentraciones en serie de EPOsp inmunorreactivas y CNPsp en pacientes con IAM documentado. Las concentraciones más altas de EPOsp y/CNPsp inmunorreactivos se observaron horas después del ingreso en el hospital y cayeron lentamente a niveles estables durante aproximadamente ocho horas. Es importante destacar que los niveles promedio de EPOsp y CNPsp fueron 2 a 3 veces más altos (rango dos a cinco veces más alto) que los niveles en voluntarios sanos normales. Las concentraciones máximas de mioglobina

ocurrieron 1-2 horas después del ingreso en el hospital, mientras que los niveles máximos de Tnl y CK-MB no se alcanzaron hasta 8-12 horas después del ingreso.

Ejemplo 2

Se sometieron a cateterismo ocho pacientes con sospecha de SCA clínicamente estable y se extrajeron muestras de sangre de múltiples órganos: la arteria femoral FA (1) y FA (2), la vena femoral (VF), la vena renal (VD), la vena hepática (HV), la vena cava inferior (IVC), la yugular (JUG), la vena del seno coronario cardíaco (CS) y la arteria pulmonar (PA). Se recogió sangre en tubos EDTA enfriados, se prepararon a partir de plasma por centrifugación y el plasma se sometió a RIA de EPOsp y CNPsp inmunorreactivos. La Figura 2 muestra claramente que el sitio con la concentración más alta de CNPsp inmunorreactivo es el CS, la vena que drena el corazón, especialmente los ventrículos. Esto es una prueba de que el corazón puede secretar CNPsp inmunorreactivo (por ej., fragmentos de CNPsp). También se pueden secretar los EPOsp inmunorreactivos, particularmente en forma de fragmentos de EPOsp.

Ejemplo 3

Los extractos de plasma de 10 pacientes con insuficiencia cardíaca descompensada aguda y 75 pacientes con insuficiencia renal crónica fueron sometidos a inmunoensayo de EPOsp y EPO específico. **Panel superior:** Tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) en 10 pacientes con insuficiencia renal crónica. Hubo una relación estadísticamente significativa negativa entre la TFGe y el EPOsp plasmático. **Panel central:** Concentraciones plasmáticas de EPOsp en individuos normales sanos, pacientes con insuficiencia renal crónica y en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda descompensada. Las concentraciones plasmáticas de EPOsp están significativamente elevadas en pacientes con insuficiencia renal crónica e insuficiencia cardíaca. **Panel inferior:** La proporción de EPOsp/EPO en individuos normales, pacientes con insuficiencia renal crónica y pacientes con insuficiencia cardíaca aguda. La proporción en los individuos normales sanos es de aproximadamente 6:1, mientras que en la insuficiencia renal crónica la proporción aumenta significativamente (en comparación con los individuos normales) hasta aproximadamente 10:1. Por el contrario, en la insuficiencia cardíaca aguda, la proporción entre EPOsp y EPO se reduce significativamente (en comparación con los individuos normales) hasta aproximadamente 3:1.

Conclusión

Las concentraciones de EPOsp y CNPsp circulantes en pacientes clínicamente estables se derivan probablemente de fuentes cardíacas. La secreción cardíaca significativa es consistente con EPOsp y CNPsp que son hormonas cardíacas.

DISCUSIÓN

Esta prueba es la primera en documentar la presencia de los fragmentos de EPOsp y CNPsp en la circulación y el espacio extracelular en las dos horas siguientes a la presentación de un paciente con SCA o a las dos horas de la aparición del SCA. Se demuestra en primer lugar que la medición de EPOsp y CNPsp inmunorreactivos en sangre tiene potencial como un biomarcador rápido de isquemia cardíaca aguda y/o lesión subsiguiente y en segundo lugar, que la medición de EPOsp y CNPsp inmunorreactivos después del acontecimiento tiene mérito potencial como un marcador de pronóstico y resultado a largo plazo.

También mostramos que la medición de EPOsp y CNPsp inmunorreactivos tienen un potencial uso en la enfermedad renal aguda o crónica y el potencial para actuar como biomarcadores de la función/disfunción renal aguda o crónica.

Los expertos en la materia apreciarán por supuesto que la descripción anterior se proporciona a título de ejemplo y que la invención no está limitada a la misma.

DOCUMENTOS CITADOS

1. Universal definition of myocardial infarction. Consensus statement from the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Taskforce for the redefinition of myocardial infarction. *Circulation* 2007 116:2634-2653.
2. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for standardisation of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007 115:e352-e355.
3. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Acute myocardial infarction Chp. 35 Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 6th ed. 2001. pgs. 1114-1231.
4. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998 97:1921-1929.
5. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide on admission for early

risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J. Am. Coll. Cardiology* 2002 40:437-445.

6. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, Hartford M, Caidahl K. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002 106:2913-2918.

7. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II *Circulation* 2003 108: 1772-1778.

8. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008 52:1527-1539.

9. Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin. Endocrinol.* 1997 47:287-296.

10. *The Immunoassay Handbook*. 3rd edition, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005.

11. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998 391:795-799.

12. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980 77:5201-5205.

13. Huston JS, D Levinson, M Mudgett-Hunter, MS Tai, J Novotný, MN Margolies, RJ Ridge, RE Brucoleri, E Haber, R Crea. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988 85:5879-5883.

14. Harbour E, Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988 Cold Spring Harbour Press New York.

15. Kohler G, Milstein C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 1975 256: 495-497.

16. Verhoeyen M, Milstein C, Winter G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 1988 239: 1534-1536.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardíaco en un sujeto seleccionado del grupo que consiste en síndromes coronarios agudos incluyendo infarto agudo de miocardio (IAM) y angina, insuficiencia cardíaca, placa vulnerable y enfermedad vascular incluyendo aterosclerosis o para predecir, diagnosticar o controlar una enfermedad, lesión o trastorno renal agudo y/o crónico en un sujeto, comprendiendo el método:
 - (a) medir el nivel del fragmento de CNPsp de la SEQ ID NO: 6 en una muestra biológica del sujeto y
 - (b) comparar el nivel de dicho fragmento de CNPsp con el nivel de un control, en el que un nivel medido de dicho fragmento de CNPsp superior al nivel del control es indicativo de dicho trastorno cardíaco o de dicha enfermedad, lesión o trastorno renal.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho método se usa para evaluar o controlar una respuesta al tratamiento de un trastorno cardíaco agudo o crónico en un sujeto, o para evaluar o controlar una respuesta al tratamiento de una enfermedad o trastorno renal agudo o crónico en un sujeto en el que un cambio en el nivel medido de dicho fragmento de CNPsp respecto al nivel de control es indicativo de una respuesta al tratamiento.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el método: (i) medir el nivel de dicho fragmento de CNPsp en una muestra biológica del sujeto en las primeras cuarenta y ocho horas, veinticuatro horas, doce horas, seis horas, cuatro horas, dos horas, una hora o 30 minutos después de la aparición o la presentación clínica con dicho trastorno cardíaco o dicho trastorno o enfermedad renal.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que: (i) un nivel de dicho fragmento de CNPsp en la muestra en el intervalo de 40 a 250 pmol/l, 65 a 200 pmol/l, 70 a 150 o 70 a 130 pmol/l, es indicativo de un SCA y/o (ii) un nivel de dicho fragmento de CNPsp en la muestra que es de 1,5 a 10, 1,5 a 5 o 2 a 3 veces mayor que el nivel del control es indicativo de un SCA y/o (iii) el trastorno cardíaco agudo es un infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST en el ECG a la presentación, angina inestable, un infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST; isquemia cardíaca, lesión cardíaca aguda, daño cardíaco agudo resultante de toxicidad farmacológica aguda o una miocardiopatía aguda.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes: (i) en el que la muestra biológica es una muestra de sangre, sangre venosa, sangre arterial, plasma, suero, saliva, líquido intersticial, orina o muestra de tejido cardíaco y/o el nivel de dicho fragmento de CNPsp se mide usando un ensayo seleccionado de espectroscopía de masas (incluyendo SELDI, ESI, MALDI o FTIC), RIA, ELISA, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico y ensayo inmunoradiométrico.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además medir el nivel de uno o más marcadores no CNPsp de dicho SCA y comparar los niveles con los niveles de un marcador de control en el que una desviación en el nivel medido del nivel del control, junto con un nivel medido de dicho fragmento de CNPsp que es más alto que el nivel de control de dicho fragmento de CNPsp es predictivo o diagnóstico del SCA o puede usarse para controlar dicho SCA y en el que el marcador no CNPsp se selecciona del grupo que consiste en troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, ANP, ANP-SP, BNP, NT-BNP, BNP-SP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, albúmina modificada por isquemia, endotelina, adrenomedulina, renina y angiotensina II.
7. Uso de un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente o selectivamente al fragmento de CNPsp de la SEQ ID NO:6 en un ensayo para evaluar un acontecimiento o trastorno biológico llevado a cabo en una muestra biológica de un sujeto; en el que el acontecimiento o trastorno biológico es un SCA o un trastorno renal.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico o humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo y/o en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo está marcado con un marcador detectable.
9. Un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente o específicamente al fragmento de CNPsp de la SEQ ID NO:6.
10. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 9, que es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico o humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo, y/o que está marcado con un marcador detectable.
11. Un péptido aislado que es el fragmento de CNPsp de la SEQ ID NO:6.
12. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 11 en la preparación de un anticuerpo.

13. Un ensayo para un péptido de acuerdo con la reivindicación 11 en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo el ensayo la puesta en contacto de dicha muestra con un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 y la detección y medición del nivel de dicho péptido en la muestra usando cualquier método conocido.
- 5 14. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 13, en el que: (i) la muestra biológica es una muestra de sangre, sangre venosa, sangre arterial, plasma, suero, saliva, líquido intersticial, orina, muestra de tejido cardíaco o muestra de tejido renal; (ii) el nivel de dicho péptido se mide usando espectroscopía de masas o (iii) el nivel de dicho péptido se mide usando un ensayo seleccionado de RIA, ELISA, ensayo inmunofluorométrico y ensayo inmunorradiométrico.
- 10 15. Un kit para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardíaco agudo, que comprende un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 9 y opcionalmente comprende instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar dicho trastorno cardíaco agudo en un sujeto en las seis o cuatro horas después del inicio, o presentación clínica, del nivel de un CNPsp, o fragmento de CNPsp del mismo, medido en una muestra biológica obtenida en las seis o cuatro horas después del inicio o presentación clínica con un SCA y
- 15 opcionalmente en el que el kit se calibra para medir los niveles de CNPsp o fragmento de CNPsp del mismo, en el intervalo de 0,1 a 1500 pmol/l, 0,1 a 350 pmol/l, 1 a 300 pmol/l, 10 a 250, o 20 a 150 pmol/l.

Secuencias de péptidos de señal de EPO y CNP
(notación de aminoácidos de una sola letra)

EPO	MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG
CNP	MHLSQLLACALLLTLLSLRPSEA

FIG. 1

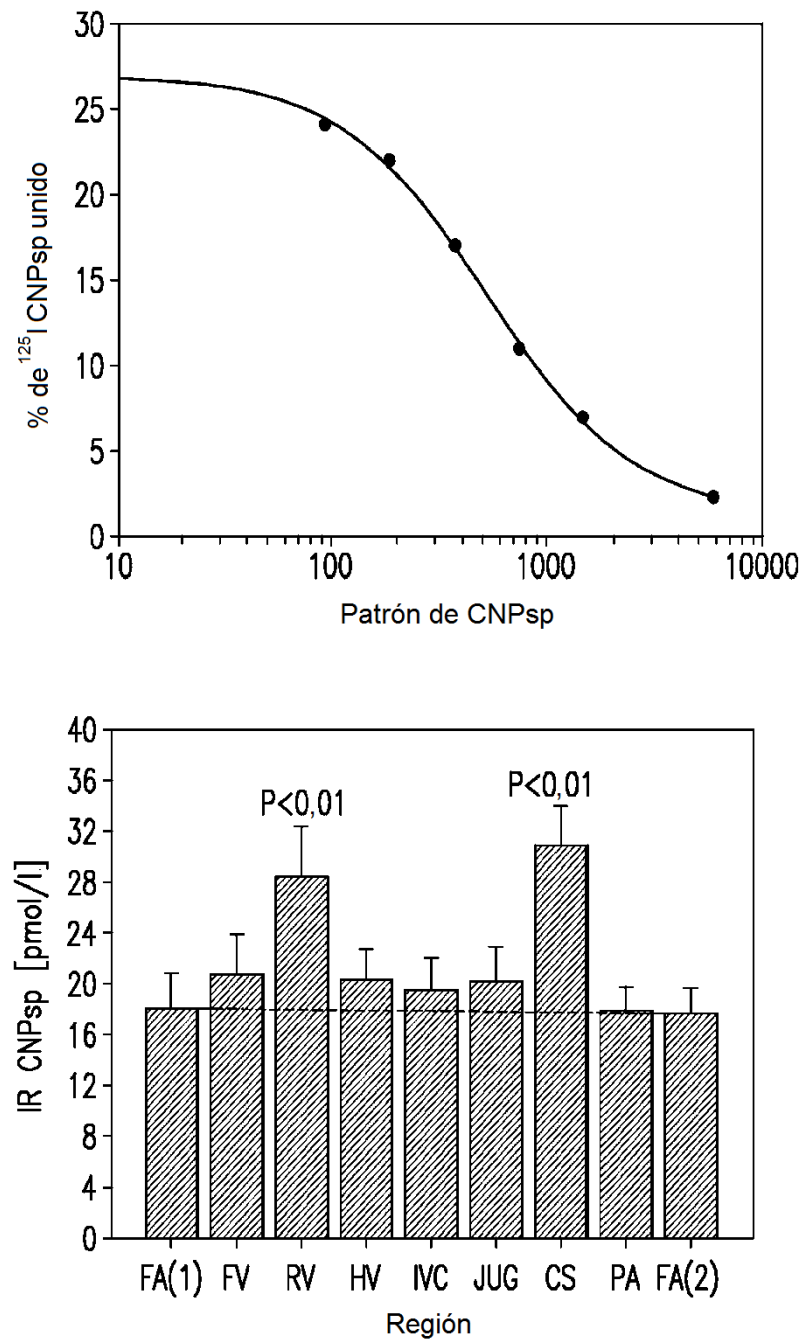


FIG. 2

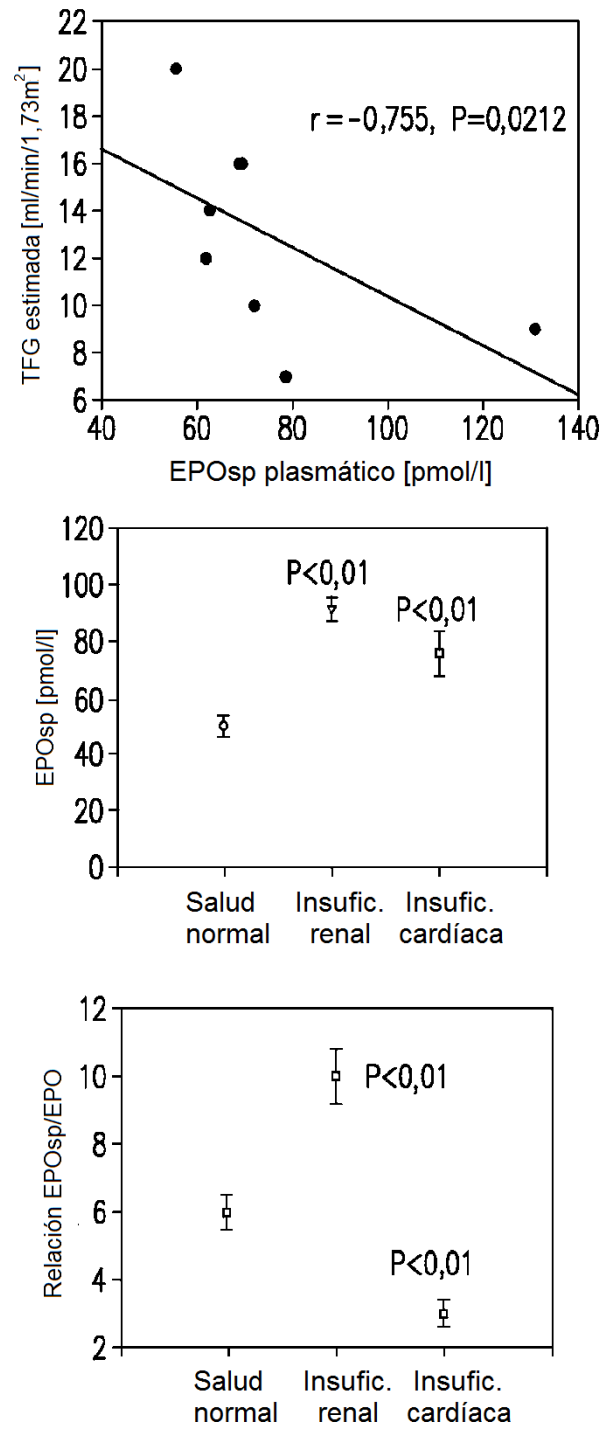


FIG. 3

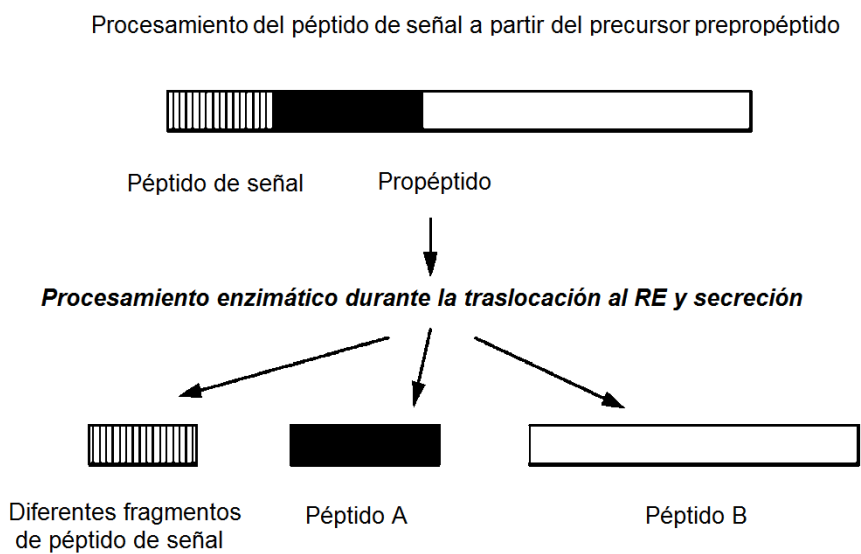


FIG. 4

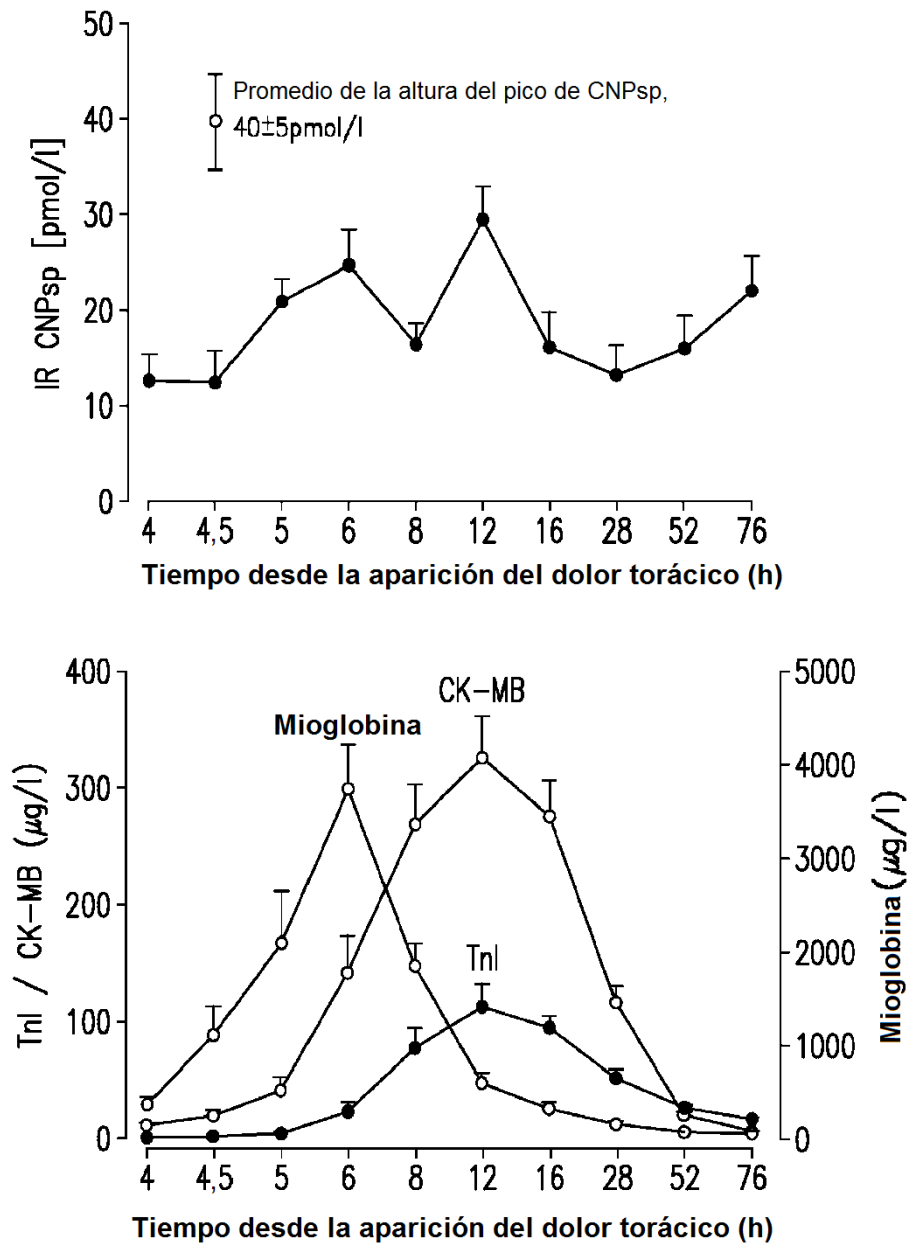


FIG. 5

Datos de reactividad cruzada entre péptidos para los antisueros de EPOsp y CNPsp (%)

proBNP(1-13)	<0,003
proBNP(1-76)	<0,01
proANP(1-30)	<0,009
Insulina	<0,003
IGF-I	<0,002
IGF-II	<0,006
ANP	<0,008
BNP	<0,009
Endotelina 1	<0,006
Angiotensina II	<0,003
Angiotensina (1-7)	<0,01
Urotensina II	<0,003
CNP	<0,006
Grelina	<0,007
C-Grelina	<0,01
proCNP(1-15)	<0,008
Adrenomedulina	<0,01
Urocortina I	<0,01
Urocortina II	<0,01
BNP-SPn(1-10)	<0,001
ANP-SPc(16-25)	<0,001
ANP-SPn(1-10)	<0,001
INS-SPn(1-9)	<0,001
Grelina-SP (1-9)	<0,002
Clopidogrel	0
Morfina	0
Aspirina	0

FIG. 6