

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 516**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 14/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/NZ2013/000043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13141716**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13764431 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2828282**

54 Título: **Biomarcadores**

30 Prioridad:
20.03.2012 US 201261613311 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:
**OTAGO INNOVATION LIMITED (100.0%)
87 St. David Street
Dunedin, NZ**

72 Inventor/es:
**PEMBERTON, CHRISTOPHER JOSEPH;
RICHARDS, ARTHUR MARK y
BYERS, MATHEW SIMON**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 661 516 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

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a biomarcadores de fragmentos peptídicos señal de grelina. También se refiere a los métodos y kits de biomarcadores de fragmentos peptídicos de grelina y a su uso, por ejemplo, en el pronóstico, diagnóstico y control de infecciones por neumonía, insuficiencia cardíaca o neumonía e insuficiencia cardíaca, y acontecimientos o estados biológicos relacionados que tienen como resultado la liberación de los fragmentos peptídicos en la circulación.

Antecedentes

15 En los pacientes que acuden a los servicios de urgencias del hospital con dificultad para respirar (disnea) como el síntoma principal, las causas de su estado pueden ser múltiples. La dificultad respiratoria puede ser causada por trastornos cardíacos, pulmonares, trastornos de las vías respiratorias, no cardiopulmonares o infecciosos (solos o en combinación) y es importante realizar un diagnóstico oportuno y preciso. Las estrategias de diagnóstico diferencial para abordar este enfoque incluyen el estudio clínico, el historial del paciente y los resultados de las pruebas invasivas/no invasivas.

Con respecto a las enfermedades infecciosas, la neumonía representa un desafío significativo en términos de diagnóstico rápido y el número de pacientes, y el médico dispone de opciones limitadas de biomarcadores.

25 La neumonía es una forma de infección respiratoria aguda, que es causada por varios patógenos bacterianos, virales y fúngicos que incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, el virus sincitial respiratorio y en pacientes con VIH, *Pneumocystis jiroveci*. La infección resultante se caracteriza por la inflamación de los alvéolos y la acumulación de líquido en los pulmones. Los síntomas de la neumonía incluyen dificultad para respirar, aumento del ritmo respiratorio, tos, fiebre, escalofríos y dolor torácico.

30 La neumonía tiene una alta tasa de morbilidad y mortalidad, Radiological imaging in pneumonia: recent innovations. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2007;13(3):159-169. Se reconoce como una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, superior al VIH, la malaria y el sarampión combinados (UNICEF, Pneumonia: the forgotten killer of children., 2006, UNICEF/OMS, Ginebra, Suiza). Cada año, la neumonía mata a aproximadamente 1,8 millones de niños menores de cinco años, representando el 20 % de todas las muertes en este grupo de edad y representa cuatro muertes pediátricas por minuto (OMS, Hoja informativa N.º 331, octubre de 2011). Se ha encontrado que la incidencia de la neumonía está estrechamente relacionada con las desigualdades de salud, dándose la mayor prevalencia en el sur de Asia y el África subsahariana.

40 En los Estados Unidos, más de 3 millones de personas desarrollan neumonía cada año. De estos, aproximadamente el 20 % requieren hospitalización con una duración promedio de estancia en el hospital de 5,2 días y una tasa de ingreso promedio de 1,17 por paciente. La neumonía representa el 3,4 % de todas las muertes de pacientes hospitalizados, lo que equivale a una tasa de mortalidad de 16,5 por 100.000 habitantes (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, FastStas Neumonía, enero de 2012). Además de la carga impuesta por la neumonía en el contexto hospitalario, la neumonía adquirida en la comunidad tiene como resultado más de 10 millones de visitas a los médicos de atención primaria y 64 millones de días de actividad restringida por año (Mandell L.A. Epidemiology and etiology of community-acquired Pneumonia, Infect Dis Clin North Am. 2004;18(4):761-76).

50 El diagnóstico clínico de la neumonía se complica por el hecho de que los síntomas no son fiablemente predictivos. En un estudio de 308 pacientes que acudieron a urgencias, la tos fue el síntoma más común en pacientes con neumonía (86 %), aunque fue igualmente frecuente en pacientes con otras enfermedades respiratorias. El 31 % de los pacientes con neumonía no presentaba fiebre, en menos del 50 % de los pacientes con neumonía se observaron hallazgos anormales en el examen pulmonar, mientras que las constantes vitales anormales (temperatura mayor de 37,8 grados C, pulso mayor de 100/min, o frecuencia respiratoria mayor de 20/min) fueron los mejores predictores en el 97 % de los pacientes con neumonía. Gennis P., et al., Clinical criteria for the detection of Pneumonia in adults: guidelines for ordering chest roentgenograms in the emergency department. J Emrg Med, 1989; 7(3):263-8.

60 Basándose en las directrices actuales de la Sociedad Americana del Tórax y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, el patrón de oro para diferenciar la neumonía de la bronquitis aguda en pacientes que acuden a los servicios de urgencias es la presencia de infiltrados pulmonares observados en una radiografía de tórax. Sin embargo, los resultados de las radiografías de tórax son un predictor inconsistente, debido a la variabilidad en la interpretación, y no pueden establecer el agente patógeno causante. Además, a los pacientes que presentan neumonía adquirida en la comunidad en un entorno ambulatorio pueden no prescribírselos una radiografía de tórax debido a la accesibilidad y el costo limitados. Evertsen J., et al., Diagnosis and management of Pneumonia and bronchitis in outpatient primary care practices, Primary Care Resp J, 2010; 19(3):237-241.

Debido a las dificultades en el diagnóstico clínico preciso, los médicos utilizan con frecuencia diagnósticos de laboratorio para ayudar a diferenciar la neumonía de la infección aguda del tracto respiratorio (ARTI) e identificar el patógeno causal para determinar el tratamiento más apropiado. Los diagnósticos de laboratorio incluyen microscopía y cultivo de muestras del tracto respiratorio inferior, hemocultivos, detección de antígenos en la orina y serología. Bartlett, J. G., Decline in microbial studies for patients with pulmonary infections, Clin. Infect. Dis. 2004; 39; 170-172. Los últimos años han surgido nuevos diagnósticos en las áreas de detección de antígenos y ácidos nucleicos, y los ensayos de detección de antígenos comerciales están ahora disponibles para varios patógenos de neumonía, particularmente *S. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, y algunos virus respiratorios. Una nueva generación de pruebas inmunocromatográficas de detección del antígeno urinario neumocócico que detectan el antígeno de pared celular de polisacáridos C ha demostrado ser útil para diagnosticar la neumonía neumocócica en adultos (Werno, A.M., et al., Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease, Clin. Infect. Dis. 2008; 46: 926-932). Actualmente varias pruebas comerciales de resultados rápidos, que usan inmunocromatografía, enzimoimmunoensayo u otros formatos, están disponibles para virus respiratorios, incluidos el virus de la gripe y los virus respiratorios sincitiales, que ayudan a diferenciar la ARTI y la gripe de la neumonía.

Las pruebas de detección de ácido nucleico (NAT), como PCR, también se han desarrollado para los principales patógenos neumónicos, y están disponibles como plataformas multiplex. Las NAT son capaces de detectar niveles muy bajos de ácido nucleico de patógenos respiratorios, no dependen de la viabilidad del microbio diana y pueden proporcionar información sobre la presencia de fenotipos de resistencia a antibióticos. Murdoch D.R., et al., Breathing New Life into Pneumonia Diagnostics, J of Clin Micro, 2009; 47(11):3405-3408). A pesar del alto nivel de sensibilidad y especificidad exhibido por las NAT, su aceptación comercial ha estado limitada por el costo y el tiempo requeridos para realizar la prueba. Hindiyeh, M., et al., Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detection of seven respiratory viruses in clinical specimens, Am. J. Clin. Pathol. 2001; 116:218-224.

En resumen, muy a menudo, los signos clínicos de neumonía pueden ser muy elusivos. El dilema sigue siendo la pregunta: "¿cuál es la forma más rápida de llegar al diagnóstico correcto?" Debido a que cuanto más rápido se llega el diagnóstico, antes comienza el tratamiento. Sin embargo, casi siempre hay un gran lapso de tiempo entre el momento de inicio de los síntomas y el inicio de la terapia con antibióticos debido a un diagnóstico tardío. En un intento por lograr el diagnóstico rápido de la neumonía y la reducción de los ciclos de antibióticos, ahora se está contemplando el uso de biomarcadores.

Los médicos están cada vez más interesados en el uso de biomarcadores ya que no existe un "patrón de oro" que sea lo suficientemente sensible y específico como para ayudarlos a alcanzar el diagnóstico "correcto" de neumonía. Un diagnóstico "correcto" sería uno en el cual el patógeno causal se puede identificar morfológicamente. Sin embargo, en el 70 % de los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) radiológicamente confirmada no está identificado el microorganismo causal identificado. Algunos de los biomarcadores que están a la vista como un complemento en el diagnóstico de la neumonía incluyen la proteína C reactiva, el recuento de leucocitos, las inmunoglobulinas y las citocinas proinflamatorias. Hay otros biomarcadores cuya importancia está creciendo, concretamente, la procalcitonina (PCT) y el receptor de activación expresado en las células mieloides-1 (TREM-1). Otros posibles biomarcadores en estudio para su posible uso en la neumonía incluyen copeptina, cortisol, endotoxina, proadrenomedulina, entre otros. Hanssa Summah and Jie-Ming Qu, Biomarkers: A Definite Plus in Pneumonia, Mediators Inflamm. 2009: 675753 (Published online 2009 November 16).

La insuficiencia cardíaca estable crónica puede descompensarse fácilmente y conducir a insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF). La ICAD consiste en un empeoramiento de los síntomas, generalmente dificultad para respirar (disnea), edema y fatiga, en un paciente con una enfermedad cardíaca existente. Es una causa común y potencialmente grave de dificultad respiratoria aguda, y su signo clínico más evidente es la distensión venosa yugular. El péptido natriurético cerebral (BNP) es un biomarcador bien documentado y utilizado para el diagnóstico de ICAD, en el que los niveles elevados en la sangre en relación con un nivel de control o referencia son diagnósticos de esta afección.

La detección precisa y rápida de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la neumonía como causa de disnea es un problema importante y que absorbe mucho tiempo a los médicos del servicio de urgencias o a los médicos de cabecera. Esto se debe a que el diagnóstico inexacto o incompleto junto con el tratamiento incorrecto resultante puede tener un desenlace mortal, debido a un tratamiento incorrecto o retrasos en la implementación del tratamiento correcto.

Actualmente no hay biomarcadores aceptados o usados regularmente para la detección de la neumonía. Además, no existe un solo marcador o panel de biomarcadores que pueda diagnosticar si un paciente tiene ADHF y neumonía. Esto es de vital importancia, ya que a menudo se pasa por alto el diagnóstico de neumonía en pacientes con una ADHF diagnosticada, una situación que compromete gravemente el tratamiento efectivo de dichos pacientes y puede tener un desenlace mortal.

El péptido señal de grelina humana (GHRsp) es un péptido de 23 aminoácidos escindido de la grelina (preprogrelina) (1-117) (SEQ ID NO: 1). El procesamiento de la preprogrelina humana se muestra en la Figura 1. El GHRsp humano (1-23) se muestra por separado en la SEQ ID NO: 2. El documento WO 2009/113880 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos relacionada Número de serie 12/922444 (Publicación N.º 20110008808) describen y reivindican

agentes de unión y ensayos de péptidos y fragmentos señal de grelina, que incluyen GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3), los cuales se describe que son útiles en métodos para predecir, diagnosticar, evaluar o controlar trastornos cardíacos agudos, trastornos del procesamiento de la glucosa y diabetes en un sujeto.

5 Es importante destacar, por ejemplo, que los solicitantes han descubierto que los fragmentos peptídicos de señal de grelina son un biomarcador nuevo y fiable para la neumonía, así como un biomarcador nuevo y fiable para la insuficiencia cardíaca aguda descompensada y un biomarcador nuevo y fiable para pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada.

10 **Breve resumen**

Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria tienen muchos atributos y realizaciones que incluyen, pero no se limitan a, las expuestas o descritas o referenciadas en este breve resumen. No pretende estar todo incluido y las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria no están limitadas a o por las características o realizaciones identificadas en este breve resumen, que se incluye solo con fines de ilustración y no de restricción.

15 Los solicitantes hicieron el descubrimiento de que los fragmentos peptídicos señal de grelina (GHRsp) se liberan de forma detectable en la circulación en respuesta a la infección por neumonía. En un sujeto con neumonía, los niveles de fragmentos de GHRsp son diferentes de lo normal. GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) o ambos son útiles como marcadores de esta afección.

20 Los solicitantes también han descubierto que los fragmentos de GHRsp se liberan de forma detectable en la circulación en respuesta a la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) y en respuesta a una circunstancia en la que están presentes tanto la neumonía como la ADHF. En un sujeto con ADHF o neumonía y ADHF, por ejemplo, los niveles de fragmentos de GHRsp son diferentes de lo normal. GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) o ambos son útiles como marcadores para cualquier condición.

25 La presente invención proporciona un método para evaluar la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el método realizar un método de ensayo configurado para detectar un fragmento de péptido señal de grelina según SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 en una muestra de fluido corporal obtenida del sujeto para proporcionar un resultado del ensayo; y correlacionando el resultado del ensayo con la presencia o el estado de la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en el sujeto.

30 La presente invención proporciona además un método de ensayo para detectar neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el ensayo:

- 35 (a) unir un fragmento de péptido señal de grelina de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 obtenido de o en una muestra biológica; y
- 40 (b) determinar la presencia o cantidad de fragmento de péptido señal de grelina unido; y
- (c) correlacionar la presencia o cantidad de dicho fragmento de péptido señal de grelina unido con un valor de referencia o de control;

45 en el que una desviación en la presencia o cantidad de fragmento de péptido señal de grelina unido en la muestra respecto al valor de referencia o control es indicativo de que el sujeto tiene neumonía y ADHF.

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para evaluar la neumonía o una sospecha de infección en un sujeto. Como se describe en la presente memoria, la medición de uno o más marcadores de fragmentos de GHRsp seleccionados del grupo que consiste en GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, puede ser utilizado para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización y determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía.

50 La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para evaluar la ADHF o la sospecha de ADHF, o en la evaluación de la neumonía y la ADHF o sospecha de neumonía y ADHF, en un sujeto. Como se describe en la presente memoria, la medición de uno o más marcadores de fragmentos de GHRsp seleccionados del grupo que consiste en GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, puede ser utilizado para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización y determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con ADHF o sospecha de ADHF, o con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF.

60 La divulgación también proporciona un ensayo de biomarcador del fragmento de GHRsp para uso en el diagnóstico, evaluación o control de la neumonía, la insuficiencia cardíaca aguda descompensada o la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada en un sujeto.

65

Los solicitantes proporcionan en un aspecto de su divulgación un método para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización y determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada o sospecha de insuficiencia cardíaca aguda descompensada, neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada o sospecha de neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada, método que comprende medir el nivel de uno o más biomarcadores de fragmento de GHRsp en una o más muestras extraídas o derivadas del sujeto.

Por consiguiente, la divulgación también proporciona un ensayo de biomarcadores para la neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) que comprende detectar y medir el nivel de un fragmento de GHRsp en una muestra biológica o derivado de muestra de un sujeto usando cualquier método conocido para determinar la presencia o el estado de una infección por neumonía en el sujeto, o de la ADHF en el sujeto, o de neumonía y ADHF en el sujeto, incluido el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización y determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía, ADHF o sospecha de ADHF, o neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF.

La divulgación también proporciona un ensayo de un biomarcador del fragmento de GHRsp en el diagnóstico, evaluación o control de la neumonía en un sujeto con neumonía o sospecha de neumonía, que comprende:

- (a) unir uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp de una muestra;
- (b) medir el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp unido; y
- (c) correlacionar dicha medición con los valores conocidos del fragmento de GHRsp para diagnosticar, pronosticar, estratificar el riesgo, evaluar, estadificar, controlar, categorizar y/o determinar el uso de técnicas de diagnóstico y/o regímenes de tratamiento adicionales en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía. El biomarcador del fragmento de GHRsp se puede unir usando cualquier agente de unión específico del fragmento de GHRsp.

La divulgación también proporciona un ensayo de un biomarcador del fragmento de GHRsp en el diagnóstico, evaluación o control de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto con ADHF o sospecha de ADHF, que comprende:

- (a) unir uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp de una muestra;
- (b) medir el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp unido; y
- (c) correlacionar dicha medición con los valores conocidos del fragmento de GHRsp para diagnosticar, pronosticar, estratificar el riesgo, evaluar, estadificar, controlar, categorizar y/o determinar el uso de técnicas de diagnóstico y/o regímenes de tratamiento adicionales en sujetos con ADHF o sospecha de ADHF. El biomarcador del fragmento de GHRsp se puede unir usando cualquier agente de unión específico del fragmento de GHRsp.

La divulgación proporciona además un ensayo de un biomarcador del fragmento de GHRsp en el diagnóstico, evaluación o control de la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF, que comprende:

- (a) unir uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp de una muestra;
- (b) medir el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp unido; y
- (c) correlacionar dicha medición con los valores conocidos del fragmento de GHRsp para diagnosticar, pronosticar, estratificar el riesgo, evaluar, estadificar, controlar, categorizar y/o determinar el uso de técnicas de diagnóstico y/o regímenes de tratamiento adicionales en sujetos con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF. El biomarcador del fragmento de GHRsp se puede unir usando cualquier agente de unión específico del fragmento de GHRsp.

En un aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3). En una realización, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4). En otra realización, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

En otro aspecto, el nivel de uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp se analiza junto con un valor o intervalo de referencia para dichos uno o más biomarcadores, por ejemplo, un valor o intervalo de referencia normal (no infectado).

En otro aspecto, el método comprende comparar el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp en una o más muestras extraídas o derivadas del sujeto con el nivel de biomarcador del fragmento de GHRsp a partir de un control en el que una desviación en el nivel medido respecto del nivel de control es indicativa de neumonía. Las desviaciones de los sujetos de control normales (no infectados) pueden ser de aproximadamente 10-20 %, 10-30 %, 10-40 %, 10-50 %, 10-60 %, 10-70 %, 10- 80 %, 10-900 %, 10-100 % o más.

El experto en la materia puede usar una variedad de métodos para llegar a un valor umbral deseado para usar en estos métodos. Por ejemplo, el valor umbral puede determinarse a partir de una población de sujetos normales seleccionando una concentración que represente el 75, 85, 90, 95 o 99 percentil de un marcador de fragmento de GHRsp medido en tales sujetos normales. Como alternativa, el valor umbral puede determinarse a partir de una población de sujetos "enfermos", p.ej., aquellos que sufren neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía y ADHF seleccionando una concentración que representa el 75, 85, 90, 95 o 99 percentil de un marcador del fragmento de GHRsp medido en tales sujetos. En otra alternativa, el valor umbral puede determinarse a partir de una medición previa de un marcador del fragmento de GHRsp en el mismo sujeto; es decir, puede usarse un cambio temporal en el nivel de un marcador del fragmento de GHRsp en el sujeto para asignar riesgo al sujeto.

La discusión anterior no implica, sin embargo, que los marcadores del fragmento de GHRsp de la presente invención se deban comparar con los umbrales individuales correspondientes. Los métodos para combinar resultados de análisis pueden comprender el uso de regresión logística multivariante, el modelo logarítmico lineal, el análisis de redes neuronales, el análisis n de m, el análisis de árbol de decisiones, el cálculo de índices de marcadores, etc. Esta lista no pretende ser limitante. En estos métodos, un resultado compuesto que se determina combinando marcadores individuales se puede tratar como si fuera en sí mismo un marcador; es decir, se puede determinar un umbral para el resultado compuesto como se describe en la presente memoria para marcadores individuales, y el resultado compuesto para un paciente individual en comparación con este umbral.

También se pueden usar umbrales múltiples para evaluar la neumonía en un sujeto. Por ejemplo, una primera subpoblación que está infectada (por ejemplo, con neumonía) y/o está afectada (por ejemplo, con insuficiencia cardíaca) y una segunda subpoblación que no está infectada y/o afectada se pueden combinar en un solo grupo. Este grupo se subdivide a su vez en tres o más partes iguales (conocidas como terciles, cuartiles, quintiles, etc., dependiendo del número de subdivisiones). Se asigna un cociente de posibilidades a los sujetos en función de la subdivisión en la que se encuentran. Si se considera un tercil, el tercil más bajo o más alto puede usarse como referencia para comparar las otras subdivisiones. A esta subdivisión de referencia se le asigna un cociente de posibilidades de 1. Al segundo tercil se le asigna un cociente de posibilidades relativa a ese primer tercil. Es decir, alguien en el segundo tercil puede tener 3 veces más probabilidades de estar infectado en comparación con alguien en el primer tercil. Al tercer tercil se le asigna también un cociente de posibilidades a ese primer tercil.

La capacidad de una prueba en particular para distinguir dos poblaciones se puede establecer usando el análisis ROC. Por ejemplo, las curvas ROC establecidas a partir de una primera subpoblación que está infectada con neumonía y una segunda subpoblación que no está infectada se pueden usar para calcular una curva ROC, y el área bajo la curva proporciona una medida de la calidad de la prueba. Preferiblemente, los ensayos descritos en la presente memoria proporcionan un área de la curva ROC superior a 0,5, preferiblemente al menos 0,6, y más preferiblemente al menos 0,7. El mismo análisis se aplica a un sujeto afectado por insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o infectado y afectado tanto con neumonía como con ADHF.

Los solicitantes también han descubierto sorprendentemente que la concentración circulante de biomarcadores del fragmento de GHRsp es más alta en las 48-72 horas tras el inicio de los síntomas compatibles con la presentación clínica de neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía y HTPA. Los picos de concentración están en el orden de, por ejemplo, 1-2 veces más, comúnmente al menos 50 % más, que en las poblaciones de control normales en ese momento.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para predecir, evaluar, diagnosticar, categorizar o controlar la gravedad de la neumonía en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp con el nivel de GHRsp y/o del fragmento de GHRsp de un valor o intervalo de valores de control o referencia en el que un nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp en múltiples mayores que el nivel de control o valor o intervalo de valores de referencia predeterminado es indicativo de la gravedad de la neumonía en el sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para predecir, evaluar, diagnosticar, categorizar o controlar la gravedad de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp con el nivel de GHRsp y/o fragmento de GHRsp de un valor o intervalo de valores de control o referencia en el que un nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp en múltiples mayores que el nivel de control o valor o intervalo de valores de referencia predeterminado es indicativo de la gravedad de la ADHF en el sujeto.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para predecir, evaluar, diagnosticar, categorizar o controlar la gravedad de la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp con el nivel de GHRsp y/o del fragmento de GHRsp de un valor o intervalo de valores de control o referencia en el que un nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp en múltiples mayores que el nivel de control o valor o intervalo de valores de

referencia predeterminado es indicativo de la gravedad de la neumonía y de la ADHF en el sujeto.

El biomarcador del fragmento de GHRsp es, por ejemplo, GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

5 La divulgación también proporciona un método para controlar una respuesta al tratamiento de la neumonía en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra extraída o derivada del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un valor o intervalo de valores de control o referencia, en el que un cambio en el nivel medido de GHRsp respecto al nivel control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado es indicativo de una respuesta al tratamiento.

15 La divulgación proporciona además un método para controlar una respuesta al tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra extraída o derivada del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp con el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp de un valor o intervalo de valores de control o referencia, en el que un cambio en el nivel medido de GHRsp respecto al nivel control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado es indicativo de una respuesta al tratamiento.

20 La divulgación proporciona además un método para controlar una respuesta al tratamiento de la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra extraída o derivada del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador del fragmento de GHRsp con el nivel de biomarcador del fragmento de GHRsp de un valor o intervalo de valores de control o referencia, en el que un cambio en el nivel medido de GHRsp respecto al nivel control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado es indicativo de una respuesta al tratamiento.

De nuevo, el biomarcador del fragmento de GHRsp es, por ejemplo, GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

30 En un aspecto de los métodos de la invención, el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp se mide dos o más veces en muestras (o derivados de muestra) extraídas en serie de un sujeto. En varios aspectos, las muestras se toman cada 48 horas, cada 24 horas, cada 12 horas o con mayor frecuencia. Las mediciones de biomarcadores de fragmentos de GHRs individuales o múltiples dentro de estos marcos temporales están incluidos dentro de la invención. También se incluyen mediciones del biomarcador del fragmento de GHRsp o mediciones adicionales del biomarcador del fragmento de GHRsp en muestras extraídas o derivadas posteriormente de un sujeto en cualquier punto después de una muestra o ensayo inicial.

40 En un aspecto, la muestra biológica es sangre, suero, plasma, saliva, líquido intersticial, orina o lágrimas. En una realización preferida, la muestra es sangre o plasma.

45 Los marcadores se pueden medir en muestras obtenidas al mismo tiempo, o se pueden determinar a partir de muestras obtenidas a diferentes tiempos (por ejemplo, una anterior o posterior). Los marcadores individuales también se pueden medir en las mismas o diferentes muestras de fluidos corporales. Por ejemplo, se puede medir un marcador de fragmento de GHRsp en una muestra de suero o plasma y se puede medir otro marcador de fragmento de GHRsp en una muestra de orina. Además, la asignación de una probabilidad puede combinar el resultado de un ensayo de marcador de fragmento de GHRsp individual con cambios temporales en una o más variables adicionales.

50 En un aspecto, la etapa de evaluación o medición comprende detectar la unión entre el biomarcador del fragmento de GHRsp y un agente de unión que se une selectivamente al biomarcador del fragmento de GHRsp. La etapa de medición comprende en un aspecto:

- (a) unir el biomarcador del fragmento de GHRsp con un agente de unión; y
- (b) medir el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp unido; y
- (c) correlacionar el resultado con el resultado de la presencia o el estado de una infección por neumonía, la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la combinación de neumonía y ADHF en el sujeto.

En otro aspecto, el agente de unión al biomarcador del fragmento de GHRsp de la divulgación se une o detecta:

- (a) GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3)
- (b) GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4);
- (c) una variante antigénica de cualquiera de (a) o (b).

65 El agente de unión es útil para diagnosticar, evaluar o controlar, por ejemplo, la neumonía, la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la neumonía y la ADHF, que se correlaciona con la liberación de un fragmento de GHRsp en la circulación. El agente de unión en un aspecto es un anticuerpo anti-fragmento de GHRsp o un

fragmento de unión al antígeno del mismo. Más comúnmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal o, si se desea, un anticuerpo biespecífico, quimérico o humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 En un aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp que está unido o es detectado por el anticuerpo es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) o ambos. El anticuerpo puede unirse al extremo N o al extremo C del fragmento de GHRsp. Las secuencias son preferiblemente secuencias humanas.

10 Los péptidos antigénicos específicos a los que el agente de unión se une selectivamente incluyen GHRsp humano (1-9) (SEQ ID NO: 3) y/o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), o fragmentos de unión antigénica, o variantes antigénicas de los mismos.

15 En ciertos aspectos, el método de ensayo es un inmunoensayo. Los anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos para su uso en dichos ensayos se unirán específicamente a un marcador del fragmento de GHRsp de longitud completa de interés, y también pueden unirse a uno o más polipéptidos de diagnóstico que están "relacionados" a los mismos, como se define dicho término más adelante. Numerosos formatos de inmunoensayo son conocidos por los expertos en la materia. Se pueden usar ensayos cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos. Los ensayos preferidos son cuantitativos.

20 Las divulgaciones también proporcionan el uso de un ensayo de fragmento de péptido señal de grelina para la evaluación de, por ejemplo, la neumonía, la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la neumonía y la ADHF.

25 La unión del biomarcador del fragmento de GHRsp en un aspecto se mide usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que están inmovilizados en una fase sólida.

Los niveles del biomarcador del fragmento de GHRsp se pueden medir adecuadamente con un ensayo seleccionado entre RIA, ELISA, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico y ensayo inmunoradiométrico.

30 En otro aspecto, los niveles de un biomarcador del fragmento de GHRsp pueden medirse usando espectroscopía de masas.

35 Los métodos de la divulgación también comprenden medir el nivel de uno o más marcadores de fragmentos no GHRsp de neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía y ADHF, y comparar los niveles frente a niveles de un marcador de un control en el que una desviación en el nivel medido del nivel de control del marcador no GHRsp, junto con un nivel medido de GHRsp que se desvía de un control o nivel de referencia de GHRsp, es diagnóstico de neumonía, o se puede usar para controlar, por ejemplo, la neumonía, la ADHF o la neumonía y la ADHF.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía en un sujeto usando un ensayo o ensayos de uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp en combinación con recuentos de leucocitos y/o un ensayo o ensayos de uno o más de procalcitonina (PCT), receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1), proteína C reactiva, inmunoglobulinas y citocinas proinflamatorias. En un aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y/o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía en un sujeto usando un ensayo de uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp en combinación con un ensayo o ensayos de uno o más de copeptina, cortisol, endotoxina y/o proadrenomedulina. En un aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y/o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

50 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar, evaluar o controlar la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la neumonía y la ADHF en un sujeto usando un ensayo o ensayos de uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp en combinación con recuentos de leucocitos y/o un ensayo o ensayos de uno o más de procalcitonina (PCT), receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1), proteína C reactiva, inmunoglobulinas, citocinas proinflamatorias, proteína natriurética cerebral (BNP), proBNP N-terminal (NT-BNP), nitrógeno ureico en sangre, proteína de los cálculos pancreáticos, troponina I y troponina T. En un aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y/o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

55 La divulgación también se refiere al uso de un agente de unión al fragmento de GHRsp en la creación de un ensayo del fragmento de GHRsp para evaluar, por ejemplo, la neumonía, la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la neumonía y la ADHF en un sujeto, o al uso de un agente de unión del biomarcador del fragmento de GHRsp en la fabricación de una herramienta de pronóstico, evaluación, diagnóstico o control de la neumonía, la ADHF o la neumonía y la ADHF en un sujeto, es decir, una herramienta para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización de la neumonía, la ADHF o la neumonía

y la ADHF y la determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con cualquiera de las afecciones o combinaciones de afecciones mencionadas anteriormente.

5 En un aspecto, la herramienta de pronóstico, evaluación, diagnóstico y control se calibra para medir los niveles de GHRsp en el intervalo de al menos aproximadamente 0,1 pmol/l, al menos aproximadamente 1 pmol/l, al menos aproximadamente 5 pmol/l, o al menos alrededor de 10 pmol/l.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía en un sujeto, comprendiendo el kit un agente de unión al fragmento de GHRsp que se une a GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o a GHRsp (1- 10) (SEQ ID NO: 4) o a ambos. En un aspecto, el kit se calibra para medir los niveles del fragmento de GHRsp en el intervalo de al menos aproximadamente 0,1 pmol/l, al menos aproximadamente 1 pmol/l, al menos aproximadamente 5 pmol/l, o al menos aproximadamente 10 pmol/l. En un aspecto, el kit también incluye instrucciones para diagnosticar, evaluar o controlar sujetos con neumonía o sospecha de neumonía, es decir, para su uso como una herramienta para uno o más de todos del diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización de la neumonía y determinación de diagnósticos adicionales y/o regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía. Por ejemplo, las instrucciones pueden describir métodos para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía en un sujeto, a partir del nivel del fragmento de GHRsp medido en una muestra o un derivado de una muestra y comparar el nivel medido con un nivel de control o referencia. Un nivel de biomarcador del fragmento de GHRsp medido que se desvía del control o nivel de referencia será indicativo de neumonía. En un aspecto más, se obtiene más de una muestra para medir los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit para diagnosticar, evaluar o controlar la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el kit un agente de unión al fragmento de GHRsp que se une a GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o a GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) o a ambos. En un aspecto, el kit se calibra para medir los niveles del fragmento de GHRsp en el intervalo de al menos aproximadamente 0,1 pmol/l, al menos aproximadamente 1 pmol/l, al menos aproximadamente 5 pmol/l, o al menos aproximadamente 10 pmol/l. En un aspecto, el kit también incluye instrucciones para su uso en el diagnósticos, evaluación o control de los sujetos con ADHF o sospecha de ADHF, es decir, para su uso como una herramienta para uno o más de todos del diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización de la ADHF y determinación de diagnósticos adicionales y/o regímenes de tratamiento en sujetos con ADHF o sospecha de ADHF. Por ejemplo, las instrucciones pueden describir métodos para diagnosticar, evaluar o controlar la ADHF en un sujeto a partir del nivel del fragmento de GHRsp medido en una muestra o un derivado de una muestra y comparar el nivel medido con un control o nivel de referencia. Un nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp que se desvía del control o nivel de referencia será indicativo de ADHF. En un aspecto más, se obtiene más de una muestra para medir los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp.

40 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un kit para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el kit un agente de unión al fragmento de GHRsp que se une a GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o a GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) o a ambos. En un aspecto, el kit se calibra para medir los niveles del fragmento de GHRsp en el intervalo de al menos aproximadamente 0,1 pmol/l, al menos aproximadamente 1 pmol/l, al menos aproximadamente 5 pmol/l, o al menos aproximadamente 10 pmol/l. En un aspecto, el kit también incluye instrucciones para su uso en el diagnóstico, evaluación o control de los sujetos con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF, es decir, para su uso como una herramienta para uno o más de todos del diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización de la neumonía y la ADHF y determinación de diagnósticos adicionales y/o regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF. Por ejemplo, las instrucciones pueden describir métodos para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía y la ADHF en un sujeto, a partir del nivel del fragmento de GHRsp medido en una muestra o un derivado de una muestra y comparar el nivel medido con un nivel de control o referencia. Un nivel de biomarcador del fragmento de GHRsp medido que se desvía del control o nivel de referencia será indicativo de neumonía y ADHF. En un aspecto, se obtiene más de una muestra para medir los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp.

55 En diversos aspectos relacionados, la presente divulgación también se refiere a dispositivos y kits para realizar los métodos descritos en la presente memoria. Los kits adecuados comprenden reactivos suficientes para realizar un ensayo de al menos uno de los marcadores del fragmento de GHRsp descritos, junto con instrucciones para realizar las comparaciones de umbral descritas.

60 En ciertos aspectos, los reactivos para realizar tales ensayos se proporcionan en un dispositivo de ensayo, y tales dispositivos de ensayo se pueden incluir en dicho kit. Los reactivos preferidos pueden comprender uno o más anticuerpos en fase sólida, comprendiendo el anticuerpo en fase sólida un anticuerpo que detecta el o los biomarcadores diana unidos a un soporte sólido. En el caso de inmunoensayos de tipo sándwich, dichos reactivos también pueden incluir uno o más anticuerpos marcados detectablemente, comprendiendo el anticuerpo marcado detectablemente el anticuerpo que detecta el biomarcador o biomarcadores diana unidos a un marcador detectable. 65 Los elementos opcionales adicionales que pueden proporcionarse como parte de un dispositivo de ensayo se describen a continuación.

Los marcadores detectables pueden incluir moléculas que son a su vez detectables (por ejemplo, restos fluorescentes, marcadores electroquímicos, marcadores ecl (luminiscencia electroquímica), quelatos metálicos, partículas metálicas coloidales, etc.), así como moléculas que pueden detectarse indirectamente mediante la producción de un producto de reacción detectable (p.ej., enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) o mediante el uso de una molécula de unión específica que a su vez puede ser detectable (p.ej., un anticuerpo marcado que se une al segundo anticuerpo, biotina, digoxigenina, maltosa, oligohistidina, 2,4-dinitrobenzoceno, fenilarseno, ADNss, ADNds, etc.).

La generación de una señal del elemento de desarrollo de señal se puede realizar usando diversos métodos ópticos, acústicos y electroquímicos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de modos de detección incluyen fluorescencia, detección radioquímica, reflectancia, absorbancia, amperometría, conductancia, impedancia, interferometría, elipsometría, etc. En algunos de estos métodos, el anticuerpo en fase sólida se acopla a un transductor (p.ej., una red de difracción, sensor electroquímico, etc.) para la generación de una señal, mientras que en otros, una señal es generada por un transductor que está espacialmente separado del anticuerpo de fase sólida (p.ej., un fluorómetro que emplea una fuente de luz de excitación y un detector óptico). Esta lista no pretende ser limitativa. Los biosensores basados en anticuerpos también se pueden emplear para determinar la presencia o cantidad de analitos que opcionalmente eliminan la necesidad de una molécula marcada.

En otro aspecto, la divulgación proporciona GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), un nuevo péptido descubierto y aislado por los solicitantes. Por lo tanto, también se proporcionan péptidos GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) aislados y/o purificados (que incluyen GHRsp humano (1-10) (SEQ ID NO: 4) y variantes de especies de los mismos), agentes de unión a GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) que incluyen anticuerpos anti-GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) y fragmentos de unión a anticuerpos, ensayos de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) que incluyen inmunoensayos y su uso en la detección de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) en una muestra biológica, como se describe en la presente memoria. Los agentes de unión a GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) y los ensayos son útiles para diagnosticar, evaluar, controlar, etc., un evento biológico o trastorno que se correlaciona con la liberación de un fragmento de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) en la circulación. Dichos eventos o trastornos incluyen neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) y neumonía y ADHF, tal como se describe en la presente memoria, y pueden usarse para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización y determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía, ADHF o sospecha de ADHF, o neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF.

Estos y otros aspectos de la presente invención, que no están limitados a o por la información en este Breve resumen de la invención, se proporcionan a continuación.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es un diagrama esquemático que describe el procesamiento de la preproGrelina humana que da como resultado la generación de péptidos de señal, N-grelina y grelina libres.

La **Figura 2** muestra un alineamiento de consenso (SEQ ID NO: 11) para secuencias de péptido señal de grelina de rata (SEQ ID NO: 5), ser humano (SEQ ID NO: 2), oveja (SEQ ID NO: 6), cerdo (SEQ ID NO: 7), ratón (SEQ ID NO: 8), perro (SEQ ID NO: 9) y gato (SEQ ID NO: 10), respectivamente.

La **Figura 3** muestra una tabla de reactividad cruzada del antisuero biomarcador contra GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3).

La **Figura 4** muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que la inmunoreactividad de GHRsp (1-9) en sangre muestra una correlación significativa con la neumonía en sujetos humanos, con un valor ROC de 0,714. Estos datos se basan en n = 23 pacientes con infección confirmada por neumonía de una cohorte inicial de 123 pacientes humanos de la muestra.

La **Figura 5** muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que la inmunoreactividad de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre muestra una correlación significativa con la neumonía en sujetos humanos, con un valor ROC de 0,654. Estos datos se basan en n = 52 pacientes con infección confirmada por neumonía (que comprende los 23 pacientes de la cohorte inicial de pacientes humanos, Figura 4) de una cohorte total de 286 pacientes humanos de la muestra.

La **Figura 6** muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que la inmunoreactividad de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre muestra una correlación significativa con la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), con un ROC de 0,601. También se muestra la curva ROC para la proteína C reactiva (CRP).

La **Figura 7** muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que la inmunoreactividad de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre muestra una correlación significativa con la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), con un valor ROC de 0,751. También se muestra la curva ROC para la

proteína C reactiva (CRP).

Descripción detallada

5 La práctica de la presente invención puede incluir o emplear diversas técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas de recombinación e hibridoma), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, e incluyen, pero no se limitan a, solo a modo de ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook and Russel, 2001), citados conjuntamente e individualmente en la presente memoria como "Sambrook"; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, incluidos los suplementos hasta 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, y Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (citados conjuntamente e individualmente en la presente memoria como Harlow and Lane), Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); and Agrawal, ed., Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Humana Press Inc., New Jersey, 1993).

25 Debe entenderse que las invenciones no están limitadas a la metodología, protocolos, construcciones y reactivos particulares descritos en la presente memoria y, como tales, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito solamente de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. La referencia a un "fragmento de GHRsp" es una referencia a uno o más de tales péptidos, y variantes antigénicas y de especies y alélicas de los mismos, e incluye todos los equivalentes ahora conocidos o desarrollados posteriormente.

35 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenecen las invenciones. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la invención, ahora se describen diversos métodos, dispositivos y materiales.

40 Se pretende que la referencia a un intervalo de números divulgado en la presente memoria (por ejemplo 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 subintervalos de todos los intervalos expresamente divulgados en la presente memoria son expresamente divulgados. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerado deben considerarse expresamente indicados en esta solicitud de una manera similar.

45 Los siguientes términos tienen los siguientes significados cuando se usan en la presente memoria.

50 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. Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye ampliamente anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión de los mismos. También se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos multivalentes y monovalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos que han madurado por afinidad. Un anticuerpo se une de forma selectiva o específica a un polipéptido GHRsp de la invención si el anticuerpo se une preferentemente al GHRsp, p.ej. tiene menos de 25 %, o menos de 10 %, o menos de 1 % o menos de 0.1 % de reactividad cruzada con un polipéptido no GHRsp. Normalmente, el anticuerpo tendrá una afinidad de unión (valor constante de disociación (Kd)), para el antígeno o epítipo de al menos aproximadamente 10^{-6} o 10^{-7} M, o al menos aproximadamente 10^{-8} M, o 10^{-9} M, o 10^{-10} o 10^{-11} o 10^{-12} M. La afinidad de unión puede evaluarse usando resonancia de plasma superficial, por ejemplo, o análisis de Scatchard.

60 Como se usa en la presente memoria, un "fragmento de unión al antígeno" o "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión" cuando se usa en referencia a un anticuerpo, significa una porción del anticuerpo intacto que preferiblemente retiene la mayoría o la totalidad, o al menos una mínima de, las funciones de unión normales de ese fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios (ScFV) y anticuerpos multiespecíficos.

65 Como se usa en la presente memoria, la expresión "variante antigénica" se refiere a secuencias polipeptídicas

diferentes de las secuencias específicamente identificadas, en las que se delecionan, sustituyen o añaden de 1 a 6 o más restos de aminoácidos. Se contemplan específicamente sustituciones, adiciones o delecciones de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos. Las variantes pueden ser variantes antigénicas alélicas de origen natural, o variantes antigénicas no naturales. Las variantes pueden ser de la misma especie o de otras especies y pueden abarcar homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes antigénicas de los polipéptidos útiles en la invención tienen actividades biológicas que incluyen actividad de péptido señal o propiedades de unión antigénica que son iguales o similares a las de los polipéptidos parentales. La expresión “variante antigénica” con referencia a polipéptidos abarca todas las formas de polipéptidos como se define en la presente memoria. La expresión “variante antigénica” abarca polipéptidos naturales, recombinantes y producidos sintéticamente. La identidad generalmente se encuentra en una ventana de comparación de al menos 5, 6 o 7, al menos posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, para GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) la ventana de comparación puede estar en al menos 5, 6, 7 u 8 posiciones de aminoácidos, o en toda la longitud del péptido. En el contexto de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) la ventana de comparación puede estar en al menos 5, 6, 7, 8 o 9 posiciones de aminoácidos, o en toda la longitud del péptido.

En un aspecto, las variantes antigénicas incluyen péptidos cuya secuencia difiere de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) en una, dos o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, delecciones, adiciones o inserciones que no afectan indebidamente a la antigenicidad del péptido. Las sustituciones conservadoras son conocidas en la técnica y no necesitan repetirse aquí. Por lo general, incluyen la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, p.ej., 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. También se pueden encontrar ejemplos de sustituciones conservadoras en las secuencias de GHRsp tal como se muestra en las listas de secuencias en las que se muestran las sustituciones en diferentes especies de mamíferos en comparación con la secuencia humana. Se pueden tomar otras sustituciones conservadoras de la Figura 2. Pueden realizarse sustituciones, delecciones, adiciones o inserciones por métodos de mutagénesis conocidos en la técnica. Un experto conocerá los métodos para realizar sustituciones fenotípicamente silenciosas de aminoácidos. Véase por ejemplo Bowie et al., 1990, Science 247, 1306; Kunkel, T; 1985, PNAS, 85 p 488.

Se pueden usar variantes antigénicas para preparar agentes de unión, por ejemplo, agentes de unión a anticuerpo, para uso en ensayos de la invención.

La expresión “agente de unión”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier material sólido o no sólido capaz de unirse a un fragmento de GHRsp o a una variante antigénica del mismo. En un aspecto, el término se refiere a cualquier molécula natural o no natural que se une a un fragmento de GHRsp o una variante antigénica del mismo. Los ejemplos de agentes de unión incluyen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y compuestos de molécula pequeña. Un agente de unión selectivo o específico es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Los agentes de fragmento de péptido señal de GHR de la invención se combinan generalmente con un vehículo, por ejemplo un vehículo o diluyente farmacéutica o veterinariamente aceptable para producir una composición. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Los diluyentes y excipientes adecuados también incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, también pueden estar presentes sustancias deseadas tales como agentes humectantes o emulsionantes y/o agentes estabilizadores o tamponantes del pH. Además, adyuvantes u otras sustancias que potencian una respuesta inmunitaria a un antígeno tal como un GHRsp, por ejemplo, GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

El término “diagnóstico” tal como se usa en la presente memoria se refiere a métodos mediante los cuales el experto en la materia puede estimar y/o determinar la probabilidad de que un paciente padezca o no una enfermedad o afección dada. En el caso de la presente invención, “diagnóstico” incluye usar los resultados de un ensayo, más preferiblemente un inmunoensayo, para un marcador de neumonía, opcionalmente junto con otras características clínicas, para llegar a un diagnóstico (es decir, la ocurrencia o no ocurrencia) de neumonía para el sujeto del que se obtuvo o derivó una muestra y se analizó. En el caso de la presente invención, el “diagnóstico” también incluye usar los resultados de un ensayo, lo más preferiblemente un inmunoensayo, para un marcador de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o un marcador de neumonía y ADHF, opcionalmente junto con otras características clínicas, para llegar a un diagnóstico (es decir, la ocurrencia o no ocurrencia) de ADHF o neumonía y ADHF para el sujeto del que se obtuvo o derivó una muestra y se analizó. Que dicho diagnóstico esté “determinado” no implica que el diagnóstico sea 100 % confirmado. El médico experto no usará resultados de biomarcadores en un vacío informativo, sino que evaluará los resultados junto con otros indicios clínicos para llegar a un diagnóstico. Por lo tanto, un nivel de un biomarcador medido en un lado de un umbral de diagnóstico predeterminado indica una mayor probabilidad de ocurrencia de la enfermedad en el sujeto con relación a un nivel medido en el otro lado del umbral de diagnóstico predeterminado. De manera similar, un riesgo pronóstico indica una probabilidad de que se produzca un curso o resultado determinado. Un nivel o un cambio en el nivel de un indicador pronóstico, que a su vez se asocia con una mayor probabilidad de morbilidad (p.ej., empeoramiento de la función pulmonar, que incluye derrames hemorrágicos, daño alveolar difuso y hemorragia, etc.) se indica como “indicativo de una mayor probabilidad” de un resultado adverso en un paciente.

- 5 El término "epítopo" incluye cualquier determinante antigénico (por ejemplo, una proteína) capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o un receptor de linfocitos T. Es decir, un sitio en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo generalmente incluye al menos 3, 5 u 8-10 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser contiguos, o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.
- 10 Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la unión específica del anticuerpo y/o proporciona una estructura tridimensional del polipéptido. 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 antigénica polipeptídica o un derivado de la misma. En un aspecto, el fragmento conserva las propiedades de unión al antígeno de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3), GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), u otro polipéptido de la divulgación o polipéptido descrito en la presente memoria.
- 15 "GHRsp" se refiere al péptido señal de GHR completo de 23 aminoácidos de la secuencia de preprogrelina humana (SEQ ID NO: 1). También se denomina "GHRsp (1-23)", se muestra por separado en SEQ ID NO: 2. Los biomarcadores del fragmento de GHRsp incluyen polipéptidos derivados de GHRsp o relacionados con GHRsp, que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, una variante antigénica o fragmento de GHRsp. Fragmentos útiles como biomarcadores del fragmento de GHRsp incluyen GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3), es decir, los primeros nueve aminoácidos de GHRsp (1-23) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), es decir., los primeros diez aminoácidos de GHRsp (1-23). En un aspecto, GHRsp (1-23) (SEQ ID NO: 2) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) funcionan como polipéptidos antigénicos a los que se puede unir un anticuerpo. Las variantes y fragmentos de GHRsp (1-23) (SEQ ID NO: 2) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) incluyen variantes antigénicas y fragmentos que retienen al menos sus funciones de unión antigénica.
- 20 El término "aislado" tal como se aplica a las secuencias polipeptídicas divulgadas en la presente memoria se usa para referirse a secuencias que se eliminan de su entorno celular natural. Se puede obtener una molécula aislada por cualquier método o combinación de métodos que incluyen técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas. Las secuencias polipeptídicas se pueden preparar mediante al menos una etapa de purificación.
- 25 Un nivel "superior" o "inferior" a un valor de control o referencia, o un cambio, diferencia o desviación respecto a un valor de control o de referencia, en una realización es estadísticamente significativo. En otro, los niveles más altos, los niveles más bajos, la desviación y los cambios se pueden determinar mediante el recurso a los límites de referencia del ensayo o los intervalos de referencia.
- 30 Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo identificado que se ha separado o recuperado, o ambos, de un componente de su entorno natural. Por ejemplo, separado de proteínas, incluidas enzimas y hormonas. En una realización, el anticuerpo se purifica a al menos 95 %, o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % en peso de anticuerpo. La pureza se puede determinar por el método de Lowry, por ejemplo. Normalmente, el anticuerpo se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- 35 La expresión "espectrometría de masas" tal como se usa en la presente memoria se refiere a métodos de filtrado, detección y medición de iones basados en su relación de masa a carga. Véase 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 de espectrometría de masas comunes incluyen la espectrometría de masas mediante desorción-ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) y la espectrometría de masas mediante desorción-ionización por láser inducida en superficie (SELDI). Ambas pueden combinarse con analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF y SELDI-TOF) que permiten el análisis de analitos a niveles de femtomol en impulsos de iones muy cortos. Las 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 también incluyen la captura por afinidad inducida en superficie (SEAC), la desorción ordenada inducida en superficie (SEND) y la unión y liberación fotolábil inducida en superficie (SEPAR).
- 40 Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo monoclonal" significa un anticuerpo que es un anticuerpo altamente específico dirigido contra un único antígeno diana. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal a partir de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos en la que cada anticuerpo monoclonal es idéntico y/o se une al mismo epítopo, a excepción de las mutaciones naturales que pueden producirse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando métodos conocidos en la técnica.
- 45 El término "purificado" como se usa en la presente memoria no requiere pureza absoluta. Purificado se refiere en una realización a al menos 90 %, o 95 %, o 98 %, o 99 % de homogeneidad de, para proporcionar un ejemplo, un polipéptido o anticuerpo en una muestra.
- 50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "que relaciona una señal con la presencia o cantidad" de un analito refleja que las señales del ensayo están normalmente relacionadas con la presencia o cantidad de un analito
- 55
- 60
- 65

mediante el uso de una curva patrón calculada usando concentraciones conocidas del analito de interés. Como se usa la expresión en la presente memoria, un ensayo está “configurado para detectar” un analito si un ensayo puede generar una señal detectable indicativa de la presencia o cantidad de una concentración fisiológicamente relevante del analito. Debido a que un epítipo de anticuerpo es del orden de aproximadamente 4-8 aminoácidos, un inmunoensayo configurado para detectar un marcador de interés también detectará polipéptidos relacionados con la secuencia marcadora, siempre que dichos polipéptidos contengan el epítipo o epítopos necesarios para unirse al anticuerpo o anticuerpos usados en el ensayo. La expresión “marcador relacionado” como se usa en la presente memoria con respecto a un biomarcador tal como uno de los marcadores de GHRsp descritos en la presente memoria se refiere a una o más variantes antigénicas que pueden detectarse como sustituto del propio marcador o como biomarcadores independientes. La expresión también se refiere a uno o más polipéptidos presentes en una muestra biológica que se derivan del precursor del biomarcador en forma de complejo con especies adicionales, tales como proteínas de unión, receptores, heparina, lípidos, azúcares, etc.

Preferiblemente, un analito se mide en una muestra. El término “muestra” o “muestra biológica” como se usa en la presente memoria significa cualquier muestra extraída o derivada de un sujeto. Tal muestra se puede obtener de un sujeto, o se puede obtener a partir de materiales biológicos destinados a proporcionarse al sujeto. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de sangre que se evalúa para una posible transfusión en un sujeto, y una medida del analito usada para evaluar la sangre en busca de una infección por neumonía preexistente. Se incluyen muestras extraídas o derivadas de cualquier sujeto, como sujetos sanos normales y/o sujetos sanos sin antecedentes clínicos de neumonía. Las muestras preferidas son muestras de fluidos corporales. La expresión “muestra de fluido corporal” como se usa en la presente memoria se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida con el propósito de, por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, clasificación o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. En ciertos aspectos, tal muestra se puede obtener con el propósito de determinar el resultado de una infección por neumonía en curso o el efecto de un régimen de tratamiento para la neumonía. La muestra puede ser cualquier muestra conocida en la técnica en la que se pueda detectar un fragmento de GHRsp. Se incluyen fluidos corporales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, orina, derrames pleurales, líquido intersticial, líquido sinovial, linfa, lágrimas, así como tejidos, por ejemplo. Además, un experto en la materia se daría cuenta de que ciertas muestras de fluidos corporales se analizarían más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, la separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

El término “sujeto”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un organismo humano o no humano. “Sujeto” 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 (incluidos gorilas, monos rhesus y chimpancés), zarigüeyas y otros animales domésticos de granja y de zoológico. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son aplicables tanto a enfermedades humanas como a enfermedades veterinarias. Además, aunque un sujeto es preferiblemente un organismo vivo, la invención descrita en la presente memoria también se puede usar en análisis post-mortem. Los sujetos preferidos son humanos, y más preferiblemente “pacientes”, los cuales tal como se usan en la presente memoria se refiere a seres humanos vivos que pueden recibir o están recibiendo atención médica para una enfermedad o afección. Esto incluye personas sin una enfermedad definida que están siendo investigadas por signos de patología.

Los términos “tratar”, “tratamiento” y “prevenir” se refieren a medidas terapéuticas o profilácticas para aliviar, mejorar, controlar, prevenir, restringir, detener o revertir la progresión de una infección por neumonía caracterizada por un nivel de fragmento de GHRsp que muestra una desviación de los niveles de control normales.

Se puede entender que un biomarcador es cualquier biomolécula que está asociada con un estado patológico o fisiológico particular. Idealmente, un biomarcador de la neumonía, un biomarcador de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o un biomarcador de la neumonía y la ADHF debe ser uno que no se pueda detectar o cuyo valor sea muy bajo en ausencia de inflamación; debería aumentar con el aumento de los procesos inflamatorios y disminuir con la resolución de la inflamación. Existe una creciente necesidad de biomarcadores para evaluar su uso en el diagnóstico de neumonía, ADHF o pacientes tanto con neumonía como con ADHF. Véase Schuetz P, Christ-Crain M, Mueller B. Procalcitonin and other biomarkers to improve assessment and antibiotic stewardship in infections - hope or hype? *Swiss Medical Weekly*. 2009;139(23-24):318-326. Las invenciones de los solicitantes satisfacen estas necesidades.

Un experto en la materia apreciará que los términos “biomarcador” y “marcador” en el contexto de la presente invención se usan indistintamente y pretenden significar lo mismo.

La grelina (GHR) es una hormona polipeptídica producida por las células endocrinas de la placenta, el riñón, el hipotálamo y la hipófisis. En el estómago (el sitio principal de producción de grelina), las células epiteliales que recubren el fondo producen grelina. La grelina está involucrada en la regulación del equilibrio energético. La grelina actúa para aumentar el apetito, el consumo de alimentos y, en última instancia, el peso corporal en un individuo activando los centros de la alimentación hipotalámica. La hiperglucemia es inducida y la liberación de insulina es inhibida por la grelina. La grelina y su receptor también se encuentran en el tejido cardiovascular (García, E et al.; Ghrelin and Cardiovascular health, *Current Opinion in Pharmacology*, vol 6, Issue 2, 2006, p. 142-147). Como se muestra en la SEQ ID NO: 1, la preproGHR es una molécula de 117 aminoácidos (véase la Tabla 1 a continuación).

Consiste en dos cadenas polipeptídicas (A y B), unidas por puentes disulfuro. La preprogrelina (1-117) (SEQ ID NO: 1) se escinde para dar un péptido señal de 23 aminoácidos (SEQ ID NO: 2, véase la Tabla 2, a continuación), la progrelina de 94 aminoácidos y la hormona grelina de 28 aminoácidos. El procesamiento de preprogrelina humana se muestra en la Figura 1.

5

Tabla 1 - Secuencias de grelina

SEQ ID NO:1	Preprogrelina humana	MPSPGTVCSL LLLGMLWLDL AMAGSSFLSP EHQRVQQRKE SKKPPAKLQP RALAGWLRPE DGGQAEGAED ELEVRFNAPF DVGIKLSGVQ YQQHSQALGK FLQDILWEEA KEAPADK
SEQ ID NO:2	Secuencia señal de grelina humana 1-23	MPSPGTVCSL LLLGMLWLDL AMA
SEQ ID NO:3	GHRsp (1-9)	MPSPGTVCS
SEQ ID NO:4	GHRsp (1-10)	MPSPGTVCSL

10 En contradicción con los puntos de vista habituales, los solicitantes han descubierto que los fragmentos de GHRsp aparecen en la circulación en la neumonía, y que los fragmentos de GHRsp son útiles como un biomarcador circulante de la neumonía. Por ejemplo, en sujetos con neumonía, el nivel de GHRsp estará por encima del nivel control normal o de referencia.

15 Los solicitantes también han descubierto sorprendentemente que los fragmentos de GHRsp aparecen en la circulación de sujetos con insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), así como en la circulación de sujetos con neumonía y ADHF. Por ejemplo, el nivel de GHRsp estará por encima del control normal del nivel de referencia en estos sujetos.

20 Las presentes divulgaciones se refieren a métodos y composiciones y kits para diagnóstico, diagnóstico diferencial, estratificación del riesgo, control, clasificación y determinación de regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía mediante la medición de uno o más marcadores del fragmento de GHRsp. La presente divulgación también se refiere a métodos y composiciones y kits para diagnóstico, diagnóstico diferencial, estratificación del riesgo, control, clasificación y determinación de regímenes de tratamiento en sujetos con insuficiencia cardíaca aguda descompensada o sospecha de ADHF mediante la medición de uno o más marcadores de fragmentos de GHRsp. La presente divulgación se refiere además a métodos y composiciones y kits para diagnóstico, diagnóstico diferencial, estratificación del riesgo, control, clasificación y determinación de regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF mediante la medición de uno o más marcadores de fragmentos de GHRsp. En diversos aspectos, una concentración medida de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) (véase Tabla 1), arriba), por ejemplo, o uno o más marcadores relacionados con estos, están correlacionados con el estado del sujeto. En varios aspectos, el ensayo utilizado para determinar la cantidad, concentración o presencia de un marcador de fragmento de GHRsp proporciona un resultado cuantitativo (por ejemplo, una medición en pmol/l), un resultado semicuantitativo (p.ej., una concentración dentro de un intervalo o concentraciones) o un resultado cualitativo (p.ej., "Sí-No" para la infección). Los ensayos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos son bien conocidos en la técnica y no necesitan describirse aquí.

35 La divulgación proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar la neumonía en, y/o determinar otros diagnósticos que se llevarán a cabo en y/o el tratamiento de un sujeto, comprendiendo el método:

- 40 (a) medir el nivel de un fragmento de GHRsp en una muestra biológica del sujeto; y
(b) comparar el nivel del fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un nivel de control o referencia,

45 en el que una desviación en el nivel medido respecto al nivel de control o referencia es indicativa de neumonía. Además, los resultados de los métodos del marcador del fragmento de GHRsp de la invención y las comparaciones con el nivel del fragmento de GHRsp del nivel de control o referencia permiten la estratificación del riesgo, el control, la clasificación y la determinación de regímenes de tratamiento en pacientes con neumonía o sospecha de neumonía.

50 La divulgación también proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en, y/o determinar diagnósticos adicionales que se llevarán a cabo en y/o el tratamiento de un sujeto, comprendiendo el método:

- 55 (a) medir el nivel de un fragmento de GHRsp en una muestra biológica del sujeto; y
(b) comparar el nivel del fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un nivel de control o

referencia,

en el que una desviación en el nivel medido del nivel de control o referencia es indicativo de ADHF. Además, los resultados de los métodos del marcador del fragmento de GHRsp de la invención y las comparaciones con el nivel del fragmento de GHRsp de un nivel de control o referencia permiten la estratificación del riesgo, el control, la clasificación y la determinación de regímenes de tratamiento en sujetos con ADHF o sospecha de ADHF.

La presente divulgación proporciona además un método para predecir, diagnosticar o controlar la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en, y/o determinar diagnósticos adicionales que se llevarán a cabo en y/o el tratamiento de un sujeto, comprendiendo el método:

- (a) medir el nivel de un fragmento de GHRsp en una muestra biológica del sujeto; y
- (b) comparar el nivel del fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un nivel de control o referencia,

en el que una desviación en el nivel medido del control o nivel de referencia es indicativa de neumonía y ADHF. Además, los resultados de los métodos del marcador del fragmento de GHRsp de la invención y las comparaciones con el nivel del fragmento de GHRsp de un nivel de control o referencia permiten la estratificación del riesgo, el control, la clasificación y la determinación de regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía y ADHF o sospecha de neumonía y ADHF.

Los fragmentos de GHRsp se pueden medir usando métodos de ensayo cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos.

Generalmente, como se menciona en la presente memoria, la desviación será un nivel medido más alto del fragmento de GHRsp en comparación con un nivel de control, aunque esto no es necesario.

Los ejemplos de fragmentos peptídicos antigénicos específicos son GHRsp 1-9 (SEQ ID NO: 3) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

Los polipéptidos específicos de la invención incluyen un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 tal como se expone en la lista de secuencias acompañante. También se contemplan variantes antigénicas y fragmentos de estos polipéptidos como se define en la presente memoria, o secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o 4. En un aspecto, las variantes o fragmentos antigénicos son variantes o fragmentos antigénicos funcionalmente equivalentes. Es decir, las variantes o fragmentos antigénicos mantienen las funciones de SEQ ID NO: 3 o 4 como antígenos. Los polipéptidos pueden usarse en la preparación de anticuerpos del fragmento anti-GHRsp.

Además de los métodos informáticos/de base de datos conocidos en la técnica, las variantes antigénicas de polipéptidos se pueden identificar mediante métodos físicos conocidos en la técnica, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de expresión usando anticuerpos producidos contra polipéptidos de la invención (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Press, 1987) por técnicas de ADN recombinante también descritas por Sambrook et al. o identificando polipéptidos de fuentes naturales con la ayuda de tales anticuerpos.

Los polipéptidos, que incluyen polipéptidos de variantes antigénicas, se pueden preparar usando métodos de síntesis de péptidos bien conocidos en la técnica, tales como la síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (p.ej. Merrifield, 1963, en J. Am Chem. Soc. 85, 2149; Stewart et al., 1969, en Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco California; Matteucci et al. J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191, 1981 y Atherton et al., en Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach, IRL press (1989)) o síntesis automática, por ejemplo, utilizando un sintetizador de Applied Biosystems (California, EE. UU.). Las formas mutadas de los polipéptidos también pueden producirse usando métodos sintéticos tales como mutagénesis específica del sitio del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos como se describe por Adelman et al; DNA 2, 183 (1983). Véase también Protein Protocols Handbook; Walker, J. Humana Press 2002.

Los fragmentos polipeptídicos y el polipéptido de una variante antigénica pueden aislarse para el uso en la preparación de agentes de unión que incluyen, por ejemplo, agentes de unión al anticuerpo. Se pueden aislar o purificar a partir de fuentes naturales usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en la técnica, que incluyen: p.ej., HPLC, cromatografía de intercambio iónico e inmunocromatografía (p. ej., Deutscher, 1990, Ed, Methods in Enzymology, vol. 182, Guide to Protein Purification, and Protein Protocols Handbook). Como se indicó anteriormente, los polipéptidos y las variantes antigénicas tienen utilidad para generar anticuerpos y generar ligandos entre otros usos.

En términos generales, la divulgación proporciona la preparación y el uso de un ensayo de fragmento de péptido señal de grelina para la evaluación de la neumonía y kits y fabricantes relacionados, que pueden incluir o estar

asociados con instrucciones de uso.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para evaluar la infección por neumonía en un sujeto, que comprende realizar un método de ensayo configurado para detectar un fragmento de péptido señal de grelina en una muestra de fluido corporal obtenida del sujeto para proporcionar un resultado de ensayo; y correlacionar el resultado del ensayo con la presencia o el estado de una infección por neumonía en el sujeto. En un aspecto, la etapa de correlación comprende correlacionar el resultado del ensayo con uno o más de estratificación del riesgo, estadificación, clasificación y control de la existencia o el estado de una infección por neumonía en el sujeto. En otro aspecto, la etapa de correlación comprende asignar un régimen de tratamiento al sujeto basándose en el resultado del ensayo. En otro aspecto, la etapa de correlación comprende evaluar un resultado clínico después de un régimen de tratamiento de una infección por neumonía en un sujeto.

15 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para evaluar la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, que comprende realizar un método de ensayo configurado para detectar un fragmento de péptido señal de grelina en una muestra de fluido corporal obtenida del sujeto para proporcionar un resultado del ensayo y correlacionar el resultado del ensayo con la presencia o el estado de ADHF en el sujeto. En un aspecto, la etapa de correlación comprende correlacionar el resultado del ensayo con uno o más de estratificación del riesgo, estadificación, clasificación y control de la existencia o el estado de ADHF del sujeto. En otro aspecto, la etapa de correlación comprende asignar un régimen de tratamiento al sujeto basándose en el resultado del ensayo. En otro aspecto, la etapa de correlación comprende evaluar un resultado clínico después de un régimen de tratamiento de la ADHF en un sujeto.

25 En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para evaluar la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, que comprende realizar un método de ensayo configurado para detectar un fragmento de péptido señal de grelina en una muestra de fluido corporal obtenida del sujeto para proporcionar un resultado de ensayo; y correlacionar el resultado del ensayo con la presencia o el estado de neumonía y ADHF en el sujeto. En un aspecto, la etapa de correlación comprende correlacionar el resultado del ensayo con uno o más de estratificación del riesgo, estadificación, clasificación y control de la existencia o el estado de neumonía y ADHF del sujeto. En otro aspecto, la etapa de correlación comprende asignar un régimen de tratamiento al sujeto basándose en el resultado del ensayo. En otra realización, la etapa de correlación comprende evaluar un resultado clínico después de un régimen de tratamiento de la neumonía y la ADHF en un sujeto.

35 En otro aspecto más, el resultado del ensayo es una concentración medida de un fragmento de péptido señal de grelina y la etapa de correlación comprende comparar la concentración con una concentración umbral. En un aspecto, el umbral es una concentración del fragmento de péptido señal de grelina obtenido del sujeto en un momento anterior. En otros aspectos, el umbral es una concentración del fragmento de péptido señal de grelina obtenido a partir de una población de sujetos normales y/o una concentración del fragmento de péptido señal de grelina obtenido de una población sujeto. En otro aspecto más, el umbral es una concentración del fragmento de péptido señal de grelina seleccionado para distinguir de una población de sujetos una primera subpoblación que tiene, por ejemplo, neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía y ADHF respecto a una segunda subpoblación que no tiene estas afecciones o combinación de afecciones.

45 En otro aspecto más, el sujeto se selecciona para la evaluación de la neumonía basándose en uno o más síntomas de neumonía, incluida la tos con producción de esputo, fiebre, derrame pleural, dolor torácico agudo en la inspiración y disnea.

En otro aspecto más, el sujeto se selecciona para la evaluación de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) basándose en uno o más síntomas de ADHF, que incluyen dificultad para respirar (disnea), edema y fatiga.

50 En otro aspecto más, el sujeto se selecciona para la evaluación de la neumonía y la ADHF basándose en uno o más síntomas de neumonía, incluyendo tos con producción de esputo, fiebre, derrame pleural, dolor torácico agudo en la inspiración y disnea y/o uno o más más síntomas de ADHF, incluyendo dificultad para respirar (disnea), edema y fatiga.

55 En otro aspecto más, la etapa de correlación comprende evaluar si la neumonía, la ADHF o la neumonía y la ADHF están mejorando o empeorando en un sujeto en función del resultado del ensayo.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para controlar la respuesta de un sujeto al tratamiento de la neumonía, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp de la neumonía en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un control, referencia o intervalo de referencia en el que un cambio en el nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp respecto al nivel de control o referencia es indicativo de una respuesta al tratamiento.

65 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para controlar la respuesta de un sujeto al tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp de la ADHF en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de

dicho fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un control, referencia o intervalo de referencia en el que un cambio en el nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp respecto al nivel de control o referencia es indicativo de una respuesta al tratamiento.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para controlar la respuesta de un sujeto al tratamiento de la neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador del fragmento de GHRsp de neumonía y de ADHF en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho fragmento de GHRsp con el nivel del fragmento de GHRsp de un control, referencia o intervalo de referencia en el que un cambio en el nivel medido del biomarcador del fragmento de GHRsp respecto al nivel de control o referencia es indicativo de una respuesta al tratamiento.

El lector experto apreciará que, para fines de evaluación, el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp se correlacionará generalmente con un valor o intervalo de referencia o un valor de control.

- 15 Como se usa en la presente memoria, un control puede ser un individuo o grupo del que se toman muestras de biomarcador del fragmento de GHRsp y se determina un nivel medio de biomarcador del fragmento de GHRsp. Habitualmente, el individuo o grupo comprenderá individuos sanos normales o un grupo de individuos que no se sabe que padecen neumonía o una afección como la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o ambas. Los datos de los ejemplos muestran que los niveles del biomarcador del fragmento de GHRsp en la mayoría de los individuos son inferiores a 12 pmol/l y la mediana del nivel de control medio fue de aproximadamente 11,1 pmol/l. Estos datos también muestran que los niveles del biomarcador del fragmento de GHRsp en individuos con neumonía son mayores a 17 pmol/l, y el nivel medio fue de aproximadamente 17,8 pmol/l. Como alternativa, el nivel de control se puede evaluar basándose en una pluralidad de lecturas de individuos o grupos analizados previamente. Como alternativa, el control puede ser una o más lecturas o la media de tales lecturas tomadas del mismo sujeto en un momento anterior.

- Los datos de los ejemplos también muestran que los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp en individuos con insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) son mayores de 16 pmol/l, y la mediana del nivel fue de aproximadamente 16,1 pmol/l, mientras que los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp en individuos con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) es mayor de 19 pmol/l, y la mediana del nivel fue de aproximadamente 19,75 pmol/l. En relación con los niveles de control, estos datos demuestran la utilidad clínica en el uso de fragmentos de GHRsp como un biomarcador de neumonía y ADHF, así como de ADHF.

- Se apreciará que la etapa de medir los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra puede ser una sola medición en una sola muestra, o mediciones repetidas en varias muestras dependiendo del paciente que se evalúa. La medición puede comprender, por ejemplo, 1 a 20 mediciones de un biomarcador del fragmento de GHRsp, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 1 o 2, o 2 o 3 mediciones, en muestras extraídas o derivadas de un sujeto en momentos diferentes. En un aspecto, las mediciones se realizan en muestras extraídas antes y después del tratamiento de neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o pacientes que presentan tanto neumonía como ADHF. También se pueden tomar medidas simples o repetidas para establecer si el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp ha aumentado o disminuido en comparación con el nivel de control normal, o los niveles o intervalos de referencia relacionados, o un nivel previamente medido para el paciente.

- En un aspecto, el método comprende medir los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp en al menos una muestra extraída dentro de aproximadamente la primera hora de presentación, seguido de medir los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp en 1 o 2 muestras extraídas en aproximadamente cuatro a ocho horas, o aproximadamente seis a doce horas, o aproximadamente doce a veinticuatro horas o más de la presentación, o la medición inicial del nivel del fragmento de GHRsp.

- La muestra biológica como se definió anteriormente puede ser cualquier material biológico en el cual un biomarcador del fragmento de GHRsp puede localizarse o secretarse. En un aspecto, una muestra biológica es una muestra biológica circulatoria, por ejemplo, sangre, suero o plasma.

Ensayos de marcador

- En general, los inmunoensayos implican poner en contacto una muestra que contiene o se sospecha que contiene un biomarcador de interés con al menos un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador. Entonces se genera una señal indicativa de la presencia o cantidad de complejos formados por la unión de polipéptidos en la muestra al anticuerpo. La señal se relaciona a continuación con la presencia o cantidad del biomarcador en la muestra (cuantitativa, semicuantitativa o cualitativa). Numerosos métodos y dispositivos son bien conocidos por los expertos en la materia para la detección y análisis de biomarcadores. Véase, p.ej., las patentes US-6.143.576; US-6.113.855; US-6.019.944; US-5.985.579; US-5.947.124; US-5.939.272; US-5.922.615; US-5.885.527; US-5.851.776; US-5.824.799; US-5.679.526; US-5.525.524 y US-5.480.792 y The Immunoassay Handbook, David Wild, ed. Stockton Press, Nueva York, 1994.

65

Los dispositivos y métodos de ensayo conocidos en la técnica pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo sándwich, competitivo o no competitivo, para generar una señal que está relacionada con la presencia o cantidad del biomarcador de interés. Los formatos de ensayo adecuados también incluyen métodos cromatográficos, de espectrometría de masas y de transferencia de proteínas. Además, ciertos métodos y dispositivos, tales como biosensores e inmunoensayos ópticos, se pueden emplear para determinar la presencia o cantidad de analitos sin la necesidad de una molécula marcada. Véase, p.ej., las patentes US-5.631.171 y US-5.955.377. Un experto en la materia también reconoce que la instrumentación robótica incluye, pero no se limita a, Beckman ACCESS®, Abbott AXSYM®, Roche ELECSYS®, Dade Behring STRATUS®. Los sistemas se encuentran entre los analizadores de inmunoensayos que son capaces de realizar inmunoensayos. Pero se puede utilizar cualquier inmunoensayo adecuado, por ejemplo, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de unión competitiva y similares.

Los anticuerpos u otros polipéptidos se pueden inmovilizar en una variedad de soportes sólidos para usar en ensayos. Las fases sólidas que pueden usarse para inmovilizar miembros de unión específica incluyen aquellas desarrolladas y/o utilizadas como fases sólidas en ensayos de unión en fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas adecuadas incluyen filtros de membrana, papeles basados en celulosa, perlas (que incluyen partículas poliméricas, látex y paramagnéticas), vidrio, obleas de silicio, micropartículas, nanopartículas, TentaGels, AgroGels, geles PEGA, geles SPOCC y placas de múltiples pocillos. Se podría preparar una tira de ensayo recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. Esta tira podría luego sumergirse en la muestra de prueba y luego procesarse rápidamente mediante lavados y etapas de detección para generar una señal medible, como una mancha de color. Los anticuerpos u otros polipéptidos pueden unirse a zonas específicas de los dispositivos de ensayo ya sea por conjugación directa a la superficie de un dispositivo de ensayo o por unión indirecta. En un ejemplo del último caso, los anticuerpos u otros polipéptidos se pueden inmovilizar sobre partículas u otros soportes sólidos, y ese soporte sólido se inmoviliza en la superficie del dispositivo.

Los ensayos biológicos requieren métodos para la detección, y uno de los métodos más comunes para la cuantificación de los resultados es conjugar un marcador detectable con una proteína o ácido nucleico que tiene afinidad por uno de los componentes en el sistema biológico que se estudia. Los marcadores detectables pueden incluir moléculas que son a su vez detectables (p.ej., restos fluorescentes, marcadores electroquímicos, quelatos de metales, etc.) así como moléculas que pueden detectarse indirectamente mediante la producción de un producto de reacción detectable (p.ej., enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) o mediante una molécula de unión específica que a su vez puede ser detectable (p.ej., biotina, digoxigenina, maltosa, oligohistidina, 2,4-dinitrobenzoceno, fenilarseniato, ADNss, ADNds, etc.)

La preparación de fases sólidas y conjugados de marcador detectables a menudo comprende el uso de reticulantes químicos. Los reactivos reticulantes contienen al menos dos grupos reactivos, y se dividen generalmente en reticulantes homofuncionales (que contienen grupos reactivos idénticos) y reticulantes heterofuncionales (que contienen grupos reactivos no idénticos). Los reticulantes homobifuncionales que se acoplan a través de aminas, sulfhidrilos o reaccionan de manera no específica están disponibles en muchas fuentes comerciales. Maleimidias, haluros de alquilo y arilo, alfa-haloacilos y disulfuros de piridilo son grupos tiol reactivos. Maleimidias, haluros de alquilo y arilo, y alfa-haloacilos reaccionan con sulfhidrilos para formar enlaces tiol éter, mientras que los disulfuros de piridilo reaccionan con sulfhidrilos para producir disulfuros mixtos. El producto de disulfuro de piridilo es escindible. Los imidoésteres también son muy útiles para enlaces cruzados entre proteínas. En el mercado existe una variedad de reticulantes heterobifuncionales, cada uno combinando diferentes atributos para lograr una conjugación correcta.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona kits para el análisis de los biomarcadores descritos para neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía y ADHF. El kit comprende reactivos para el análisis de al menos una muestra de prueba que comprende al menos un anticuerpo contra el marcador. El kit también puede incluir dispositivos e instrucciones para realizar una o más de las correlaciones de diagnóstico y/o pronóstico descritas en la presente memoria. Los kits preferidos comprenderán un par de anticuerpos para realizar un ensayo sándwich, o una especie marcada para realizar un ensayo competitivo del analito. Preferiblemente, un par de anticuerpos comprende un primer anticuerpo conjugado con una fase sólida y un segundo anticuerpo conjugado con un marcador detectable, en el que cada uno de los primeros y segundos anticuerpos se unen a un marcador de neumonía. Lo más preferiblemente, cada uno de los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Las instrucciones para el uso del kit y la realización de las correlaciones pueden ser en forma de etiquetado, que se refiere a cualquier material escrito o grabado que se adjunta o acompaña de otro modo a un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado abarca panfletos publicitarios y folletos, materiales de envasado, instrucciones, casetes de audio o video, discos de ordenador, así como también la escritura impresa directamente en los kits.

Anticuerpos

Como se indicó anteriormente, el anticuerpo o anticuerpos como se usan en la presente memoria se refieren a un péptido o polipéptido derivado de, modelado o sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de la misma, capaces de unirse específicamente a un antígeno o epítipo. Véase,

p.ej. *Fundamental Immunology*, 3ª Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)); Wilson (1994; *J. Immunol. Methods* 175: 267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Métodos* 25: 85-97. El término anticuerpo incluye porciones de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno" (p.ej., fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) que retienen la capacidad de unirse al antígeno, que incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos monocatenarios también se incluyen por referencia en el término "anticuerpo".

Para una discusión adicional de anticuerpos y fragmentos, véase por ejemplo PNAS USA 81: 6851-6855 (1984), *Protein Eng* 8(10) 1057-1062 (1995); *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Springer-verlag 1994, Rosenberg y Moore Eds; PNAS USA 90: 6444-6448 (1993); *Nature* 321: 522 - 525 (1986); *Nature* 332: 323 - 329 (1988)) y el documento WO 2005/003154.

También se incluye el antisuero obtenido inmunizando un animal tal como un ratón, rata o conejo con el fragmento de GHRsp o una variante antigénica del mismo. Los anticuerpos se pueden unir a una secuencia de fragmento de GHRsp común en un grupo de fragmentos de GHRsp, o a un fragmento de GHRsp específico, o incluso a conjuntos de fragmentos de GHRsp. En resumen, los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden generar 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 mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir GHRsp o un fragmento o variante antigénica del mismo o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de tales proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero bovino, tiroglobulina bovina e inhibidor de la tripsina de soja. Los 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 excesiva experimentación.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo Kohler y Milstein, 1975 (Kohler Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, (5517) 256, 495-497), patentes US-4.196.265, US-4.816.567 y Golemis (*supra*). Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado, como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, de la American Type Culture Collection, Virginia, EE.UU. Los inmunoensayos pueden usarse para detectar líneas celulares inmortalizadas que secretan el anticuerpo de interés. Para la selección, pueden usarse secuencias de GHRsp o fragmentos o variantes antigénicas de las mismas.

Los medios bien conocidos para establecer la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma incluyen inmunoprecipitación, inmunoensayo radioligado (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y transferencia de Western. (Lutz et al., *Exp. Cell. Res.* 175:109-124 (1988)), Golemis (*supra*) y Howard (*supra*)). Por ejemplo, como se indicó anteriormente, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., *Anal Biochem* 107:220 (1980)). Las muestras de animales inmunizados se pueden seleccionar de manera similar para determinar la presencia de anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de células hospedadoras recombinantes. El ADN que codifica el anticuerpo se puede obtener a partir de una línea celular de hibridoma. El ADN se introduce posteriormente en un vector de expresión, transfectado en células hospedadoras (p.ej., células COS, células CHO, células *E. coli*) y el anticuerpo producido en las células hospedadoras. El anticuerpo puede aislarse y/o purificarse a continuación usando técnicas estándar.

Los anticuerpos o fragmentos monoclonales también se pueden producir por medio de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente US-4.816.567). También son posibles las modificaciones del ADN tales como la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente US-4.816.567 arriba). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica (patentes US-5.334.708, US-5.821.047 y US-7.476.724). La producción de anticuerpos bivalentes quiméricos (patente US-4.816.567), (patente US-5.843.708) y anticuerpos multivalentes también se contemplan en la presente memoria (patente US-6.020.153).

También se pueden usar otras técnicas de la técnica conocidas para la producción de anticuerpos monoclonales, tales como las bibliotecas de fagos. Ver por ejemplo, *Nature* 352: 624 - 628 (1991)).

Los anticuerpos monoclonales secretados por las células pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, HPLC de fase inversa, proteína A-Sepharosa, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Véase por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982).

Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser útiles. Estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo GHRsp o una variante antigénica o fragmento de la misma, y un antígeno seleccionado del grupo que incluye preprorelina, ANP, ANP-SP, CK-MB, TnT, TnI, BNP, BNP-SP, NT-BNP, mioglobina, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, albúmina modificada por isquemia, endotelina, adrenomedulina, renina y angiotensina II. Los anticuerpos con más de dos especificidades, por ejemplo, anticuerpos triespecíficos también se contemplan en la presente memoria.

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Véase por ejemplo Milstein and Cuello 1983¹⁹, Suresh *et al.*, 1986²⁰ [javascript:popup\('A1986D161200017'\)](#) y Brennan *et al.*, 1985.²¹

Los anticuerpos usados en los inmunoensayos descritos en la presente memoria se unen específicamente a un marcador de neumonía de la presente invención. La expresión "se une específicamente" no pretende indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a la diana a la que está destinado ya que, como se indicó anteriormente, un anticuerpo se une a cualquier polipéptido que presente epítipo o los epítipos a los que se une el anticuerpo. Por el contrario, un anticuerpo se "une específicamente" si su afinidad por su diana es aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad por una molécula no diana que no muestra el epítipo o epítipos apropiados. Preferiblemente, la afinidad del anticuerpo será al menos aproximadamente 5 veces, preferiblemente 10 veces, más preferiblemente 25 veces, incluso más preferiblemente 50 veces, y lo más preferiblemente 100 veces o más, mayor para una molécula diana que su afinidad por una molécula no diana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen con afinidades de al menos aproximadamente 10^{-6} o 10^{-7} M, o al menos aproximadamente 10^{-8} M, o 10^{-9} M, or 10^{-10} , o 10^{-11} o 10^{-12} M.

La afinidad se calcula como $K_d = k_{off}/k_{on}$ (k_{off} es la constante de velocidad de disociación, k_{on} es la constante de la tasa de asociación y K_d es la constante de equilibrio). La afinidad se puede determinar en el equilibrio midiendo la fracción unida (r) del ligando marcado a diversas concentraciones (c). Los datos se representan gráficamente utilizando la ecuación de Scatchard: $r/c = K(n-r)$; donde r = moles del ligando unido/mol del receptor en el equilibrio; c = concentración del ligando libre en el equilibrio; K = constante de asociación de equilibrio; y n = número de sitios de unión del ligando por molécula receptora. Mediante un análisis gráfico, r/c se traza en el eje Y frente a r en el eje X, obteniéndose así un gráfico de Scatchard. La medición de la afinidad del anticuerpo por análisis de Scatchard es bien conocida en la técnica. Véase, p.ej., van Erp *et al.*, *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson and Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988.

Numerosas publicaciones describen el uso de la tecnología de presentación en fagos para producir y analizar bibliotecas de polipéptidos respecto a su unión a un analito seleccionado. Véase, p.ej., Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin *et al.*, *Science* 249, 404-6, 1990; Scott y Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; y Ladner *et al.*, patente US-5.571.698. Un concepto básico de los métodos de presentación en fagos es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un polipéptido a ser seleccionado y el polipéptido. Esta asociación física es proporcionada por la partícula de fago, que muestra un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite la selección masiva simultánea de un gran número de fagos que llevan diferentes polipéptidos. Los fagos que exhiben un polipéptido con afinidad por una diana se unen a la diana y estos fagos se enriquecen mediante selección de afinidad a la diana. La identidad de los polipéptidos presentados en estos fagos puede determinarse a partir de sus respectivos genomas. Usando estos métodos, un polipéptido identificado por tener una afinidad de unión por una diana deseada se puede sintetizar a granel por medios convencionales. Véase, p.ej., la patente US-6.057.098.

Los anticuerpos que se generan con estos métodos se pueden seleccionar primero seleccionando la afinidad y la especificidad con el polipéptido purificado de interés y, si es necesario, comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con polipéptidos que se desean excluir de la unión. El procedimiento de selección puede implicar la inmovilización de los polipéptidos purificados en pocillos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo o grupos de anticuerpos potenciales se coloca a continuación en los pocillos de microtitulación respectivos y se incuba durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas. Los pocillos de microtitulación se lavan a continuación y se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina si los anticuerpos producidos son anticuerpos de ratón) a los pocillos y se incuban durante aproximadamente 30 minutos y después se lavan. El sustrato se añade a los pocillos y aparecerá una reacción de color donde están presentes anticuerpos contra el polipéptido o polipéptidos inmovilizados.

Los anticuerpos así identificados pueden analizarse posteriormente para determinar su afinidad y especificidad en el diseño del ensayo seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos de una proteína diana, la proteína diana

purificada actúa como un patrón con el cual se puede juzgar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se han seleccionado. Dado que la afinidad de unión de varios anticuerpos puede diferir; ciertos pares de anticuerpos (p.ej., en ensayos sándwich) pueden interferir entre sí estéricamente, etc., pudiendo ser el rendimiento del ensayo de un anticuerpo una medida más importante que la afinidad absoluta y la especificidad de un anticuerpo.

Correlaciones del ensayo

El término “correlación” como se usa en la presente memoria en referencia al uso de biomarcadores se refiere a comparar la presencia o cantidad del biomarcador o biomarcadores en un paciente con su presencia o cantidad en personas que se sabe que padecen neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o neumonía y ADHF, o en personas que se sabe que no tienen neumonía, ADHF o neumonía y ADHF. A menudo, esto consiste en comparar el resultado de un ensayo en forma de una concentración de biomarcador con un umbral predeterminado seleccionado para que sea indicativo de la aparición o no aparición de neumonía o la probabilidad de algún resultado futuro.

La selección de un umbral de diagnóstico implica, entre otras cosas, la consideración de la probabilidad de enfermedad, la distribución de diagnósticos verdaderos y falsos a diferentes umbrales de prueba y las estimaciones de las consecuencias del tratamiento (o falta de tratamiento) según el diagnóstico. Los umbrales adecuados se pueden determinar de varias formas. Por ejemplo, un umbral de diagnóstico recomendado para el diagnóstico de infarto agudo de miocardio con troponina cardíaca es el percentil 97,5 de la concentración observada en una población normal. Otro método puede consistir en examinar muestras en serie del mismo paciente, donde se utiliza un resultado previo “basal” para controlar los cambios temporales en un nivel de biomarcador.

Como se describe en los ejemplos a continuación con respecto a la neumonía y/o la insuficiencia cardíaca aguda descompensada y los fragmentos de GHRsp, también pueden usarse los estudios de población para seleccionar un umbral de decisión. La Característica Operativa del Receptor (“ROC”) surgió del campo de detección de señales desarrollado durante la Segunda Guerra Mundial para el análisis de imágenes de radar, y el análisis ROC se usa a menudo para seleccionar un umbral capaz de distinguir mejor una subpoblación “enferma” de una “subpoblación “no enferma”. Un falso positivo en este caso ocurre cuando la persona da positivo, pero en realidad no tiene la enfermedad. Un falso negativo, por otro lado, ocurre cuando la persona da negativo, sugiriendo que está sano, cuando realmente tiene la enfermedad. Para dibujar una curva ROC, la tasa de verdadero positivo (TPR) y la tasa de falso positivo (FPR) se determinan a medida que se va variando continuamente el umbral de decisión. Dado que TPR es equivalente a la sensibilidad y FPR es igual a 1-especificidad, el gráfico ROC a veces se llama el gráfico de sensibilidad frente a (1-especificidad). Una prueba perfecta tendrá un área bajo la curva ROC de 1,0; una prueba aleatoria tendrá un área de 0,5. Se selecciona un umbral para proporcionar un nivel aceptable de especificidad y sensibilidad.

En este contexto, “enferma” se refiere a una población que tiene una característica (la presencia de una enfermedad o afección o la aparición de algún resultado) y “no enferma” se refiere a una población que carece de la característica. Si bien un único umbral de decisión es la aplicación más simple de dicho método, se pueden usar múltiples umbrales de decisión. Por ejemplo, por debajo de un primer umbral, la ausencia de enfermedad puede asignarse con una confianza relativamente alta, y por encima de un segundo umbral, la presencia de enfermedad también puede asignarse con una confianza relativamente alta. Entre los dos umbrales puede considerarse indeterminado. Esto debe ser de naturaleza solamente ilustrativa.

Además de las comparaciones de umbrales, existen otros métodos para correlacionar los resultados del ensayo con la clasificación del paciente (aparición o no aparición de la enfermedad, probabilidad de un resultado, etc.) que incluyen árboles de decisión, conjuntos de reglas, métodos bayesianos y métodos de redes neuronales. Estos métodos pueden producir valores de probabilidad que representan el grado en que un sujeto pertenece a una clasificación de una pluralidad de clasificaciones.

Las medidas de precisión de la prueba se pueden obtener como se describe en Fischer et al., Intensive Care Med. 29: 1043-51, 2003 y se usan para determinar la efectividad de un biomarcador dado. Estas medidas incluyen sensibilidad y especificidad, valores predictivos, razones de probabilidad, cocientes de probabilidades de diagnóstico y áreas de curva ROC. El área bajo la curva (“AUC”) de un gráfico ROC es igual a la probabilidad de que un clasificador clasifique un caso positivo elegido aleatoriamente más alta que uno negativo seleccionada aleatoriamente. El área bajo la curva ROC se puede considerar equivalente a la prueba U de Mann-Whitney, que analiza la mediana de la diferencia entre las puntuaciones obtenidas en los dos grupos considerados si los grupos son de datos continuos o la prueba de rangos de Wilcoxon.

Como se discutió anteriormente, los ensayos adecuados pueden exhibir uno o más de los siguientes resultados en estas diversas medidas: una especificidad mayor que 0,5, preferiblemente al menos 0,6, más preferiblemente al menos 0,7, con una sensibilidad correspondiente mayor que 0,2, 0,3 o 0,4, aún más preferiblemente al menos 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y lo más preferiblemente mayor que 0,95; una sensibilidad superior a 0,5, preferiblemente al menos 0,6, 0,7 o 0,8, incluso más preferiblemente al menos 0,9 y lo más preferiblemente al menos 0,95, con una

especificidad correspondiente mayor que 0,2, 0,3 o 0,4, aún más preferiblemente al menos 0,5, 0,6 , 0,7, 0,8 o 0,9, y más preferiblemente mayor que 0,95; al menos 75 % de sensibilidad, combinado con al menos 75 % de especificidad; un área de la curva ROC superior a 0,5, preferiblemente al menos 0,6, más preferiblemente 0,7; un cociente de posibilidades diferente de 1, preferiblemente al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos, más preferiblemente al menos aproximadamente 3 o más o aproximadamente 0,33 o menos, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 4 o más o aproximadamente 0,25 o menos, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0,2 o menos, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10 o más o aproximadamente 0,1 o menos; un cociente de posibilidades positivo (calculado como sensibilidad/(1-especificidad)) de más de 1, al menos 2, más preferiblemente al menos 3, aún más preferiblemente al menos 5, y lo más preferiblemente al menos 10; y/o un cociente de posibilidades negativo (calculado como (1-sensibilidad)/especificidad) menor que 1, menor que o igual a 0,5, más preferiblemente menor que o igual a 0,3, y lo más preferiblemente menor que o igual a 0,1.

En los ejemplos siguientes se muestra una curva ROC de ejemplo que demuestra la utilidad de la medición del fragmento de GHRsp para detectar neumonía. Inicialmente, se extrajeron muestras de sangre de 123 pacientes consecutivos (cuyo síntoma principal era la dificultad para respirar/disnea) en el momento de la presentación en el servicio de urgencias del Hospital de Christchurch, Nueva Zelanda. Se determinó que 23 de 123 pacientes (18,6 %) tenían neumonía según criterios diagnósticos de referencia independientes, que incluían estudio clínico, radiografía de tórax y análisis de laboratorio de esputo para bacterias neumocócicas. La mediana del nivel de fragmento de GHRsp para pacientes con neumonía fue de 11,1 pmol/l, mientras que la mediana para aquellos sin neumonía fue de 8,8 pmol/l. Las muestras de plasma preparadas se analizaron a continuación mediante RIA del fragmento de GHRsp descrito. El análisis posterior de estos valores de presentación revela que GHRsp es capaz de detectar neumonía, con un área bajo la curva (AUC) de ROC acompañante de 0,714 ($p < 0,01$). A partir de la curva ROC, los resultados también muestran 83 % de especificidad/48 % de sensibilidad con 11,1 pmol/l y 92 % de especificidad/35 % de sensibilidad con 13,1 pmol/l. Estos datos confirman la idoneidad del ensayo del fragmento de GHRsp para una toma de decisiones significativa y representan un buen nivel de utilidad clínica.

Se pueden combinar indicios clínicos adicionales con los resultados del ensayo de marcadores de neumonía de la presente invención. Estos incluyen radiografía de tórax, análisis de laboratorio de esputo para la infección neumocócica, etc., así como la medición de proteína C reactiva, recuento de leucocitos, inmunoglobulinas, citocinas proinflamatorias, procalcitonina (PCT) y receptor de activación expresado en células mieloides-1 (TREM-1).

La combinación de los resultados de análisis/indicios clínicos de esta manera puede comprender el uso de regresión logística multivariante, modelo logartímico lineal, análisis de redes neuronales, análisis n de m, análisis de árbol de decisión, etc. Esta lista no pretende ser limitativa.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionadas, así como los inherentes a los mismos. Las descripciones y ejemplos adicionales proporcionados en la presente memoria son representativos de ciertas realizaciones, son ejemplares, y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención.

Ensayos de péptidos

En un aspecto, la etapa de medición comprende detectar la unión entre un biomarcador del fragmento de GHRsp y un agente de unión que se une, (que incluye de forma selectiva o específica) GHRsp o un fragmento o variante antigénica del mismo. Como una etapa previa en la medición, un polipéptido del biomarcador del fragmento de GHRsp se puede unir con un agente de unión que se une a GHRsp o a un fragmento o variante antigénica del mismo.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un ensayo para un biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra biológica, comprendiendo el ensayo detectar y medir el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp en la muestra usando cualquier método conocido.

En un aspecto, la divulgación proporciona un ensayo para un biomarcador del fragmento de GHRsp que comprende:

- (a) unir uno o más polipéptidos del biomarcador del fragmento de GHRsp de una muestra biológica; y
- (b) medir el nivel del polipéptido del biomarcador del fragmento de GHRsp unido.

En un aspecto, el polipéptido del biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o una variante antigénica o fragmento del mismo. Se apreciará que en un aspecto más de un tipo de polipéptido GHRsp, se puede unir en el ensayo, por ejemplo, GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

En un aspecto, el polipéptido del biomarcador del fragmento de GHRsp se une usando un agente de unión. El agente de unión puede ser un agente de unión selectiva (específica). Es decir, tiene baja reactividad cruzada con otros marcadores de eventos biológicos, y más particularmente grelina. El agente de unión en un aspecto es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Cuando se utiliza un anticuerpo en el ensayo, el anticuerpo

se puede generar contra cualquier parte antigénica del biomarcador del fragmento de GHRsp, incluido el N-terminal o el C-terminal. En un aspecto, el anticuerpo se produce contra GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) o una variante antigénica o fragmento del mismo.

5 La presente divulgación también se refiere a tales agentes de unión, anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos y sus usos en un ensayo, o en la fabricación de un ensayo, herramienta de pronóstico, diagnóstico o control para fragmentos de GHRsp. El ensayo o herramienta se puede usar para controlar la neumonía en un sujeto, o se puede usar para controlar la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, o se puede usar para controlar a un sujeto que tiene tanto neumonía como ADHF.

10 En un aspecto, el anticuerpo se une al extremo N-terminal (1-9) de GHRsp. Un ejemplo de péptidos antigénicos específicos a los que el agente de unión se une selectivamente incluye GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3).

15 La unión de un biomarcador del fragmento de GHRsp puede detectarse por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye medios específicos (basado en anticuerpos) y no específicos (tal como HPLC en fase sólida). Más comúnmente, los anticuerpos de la presente invención se detectan usando un ensayo tal como ELISA o RIA como se indicó anteriormente. También son factibles ensayos de unión competitiva, ensayos tipo sándwich, ensayos no competitivos, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico o ensayos inmunoradiométricos, ensayos de luminiscencia, ensayos de quimioluminiscencia y análisis de espectrometría de masas como espectrometría de masas mediante desorción-ionización por láser inducida en superficie (SELDI), ionización por electronebulización (ESI), espectrometría de masas mediante desorción-ionización por láser asistida por una matriz (MALDI), espectroscopia de masas de resonancia de ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR) solos o en combinación con agentes de unión no específicos tales como los formatos de cromatografía. Véase, por ejemplo, Golemis, E y Howard G. (*supra*).

25 Convenientemente, un anticuerpo puede fijarse a un sustrato sólido para facilitar el lavado y el aislamiento del complejo GHRsp/anticuerpo. La unión de anticuerpos a un soporte sólido se puede lograr usando técnicas conocidas en la técnica. Véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, 4ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986). Los sustratos sólidos útiles para anticuerpos incluyen vidrio, nylon, papel y plásticos. De forma similar, GHRsp puede adsorberse 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 ejemplo, recubrimiento C18) u otros materiales. El sustrato puede estar en forma de perlas, placas, tubos, barras o biochips. Los ejemplos de biochips incluyen CIPHERgen, matrices ProteinChip (Ciphergen Biosystems (CA, EE. UU.)) y Packard BioChips disponibles de Perkin Elmer, EE. UU. Véase también las patentes US-6.225.047, US-6.329.209.

30 Los biochips pueden incluir una superficie cromatográfica. Los biochips o placas con ubicaciones direccionables y placas de microtitulación discretas son particularmente útiles. También se prefieren los sistemas multiplex en los que se usan perlas que contienen anticuerpos dirigidos a múltiples analitos para medir los niveles de los analitos en una sola muestra. Los analitos a medir pueden incluir otros marcadores así como GHRsp o variantes antigénicas o fragmentos de los mismos. Un ejemplo de un sistema de perlas multiplex adecuado para su uso en la presente invención es el sistema Luminex Fluorokine Multianalyte Profiling.

45 Los métodos de ensayo de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, las patentes 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 las patentes US-5.955.377 y US-5.631.171 véase también Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques pp147-158 (CRC Press, Inc 1987), Harlow and Lane (1998) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Publications, Nueva York y las patentes US 2005/0064511 para una descripción de los formatos y condiciones del ensayo.

50 Los analizadores de inmunoensayo también son bien conocidos e incluyen los sistemas Beckman Access, Abbott AxSym, Roche ElecSys y Dade Behring Status, entre otros, los cuales están perfectamente descritos²².

55 La unión de un biomarcador del fragmento de GHRsp 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 la unión de marcadores detectables tales como digoxina o enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina para formar un anticuerpo marcado seguido de una etapa de detección del marcador mediante la adición de reactivos de detección.

60 Por ejemplo, la peroxidasa de rábano se puede incubar 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 reaccionar con agentes de unión que se unen fuertemente a estas. Por ejemplo, las proteínas avidina y estreptavidina se unirán fuertemente a la biotina. A continuación, se une otro marcador medible covalentemente o se une mediante reacción directa con la proteína, o mediante el uso de agentes de reticulación comúnmente disponibles tales como MCS y carbodiimida, o mediante la adición de agentes quelantes.

65

En general, el complejo se separa de los reactivos que no han formado complejo, por ejemplo, mediante centrifugación. Si el anticuerpo está marcado, la cantidad de complejo se reflejará en la cantidad de marcador detectado. Como alternativa, un biomarcador del fragmento de GHRsp puede marcarse uniéndose a un anticuerpo y detectarse en un ensayo competitivo midiendo la reducción del biomarcador del fragmento de GHRsp marcado unido cuando el biomarcador del fragmento de GHRsp marcado unido al anticuerpo se incubaba con una muestra biológica que contiene un biomarcador del fragmento de GHRsp no marcado. Se pueden usar otros inmunoensayos, por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich.

En un aspecto, después del contacto con el anticuerpo, generalmente durante la noche durante 18 a 25 horas a 4 °C, o durante 1 a 2 a 4 horas a 25 °C a 40 °C, el biomarcador del fragmento de GHRsp marcado unido al agente de unión (anticuerpo), se separa del biomarcador del fragmento de GHRsp marcado no unido. En ensayos en fase de solución, la separación se puede llevar a cabo mediante la adición de un anticuerpo anti-gamma globulina (segundo anticuerpo) acoplado a partículas en fase sólida tales como celulosa o material magnético. El segundo anticuerpo se produce en una especie diferente a la utilizada para el anticuerpo primario y se une al anticuerpo primario. Por lo tanto, todos los anticuerpos primarios se unen a la fase sólida a través del segundo anticuerpo. Este complejo se elimina 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 al carbón vegetal y la eliminación de la solución mediante centrifugación de la filtración. El marcador en la fase separada unida o libre 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 placas de ELISA o placas de inmunoensayo), perlas sólidas o las superficies de los tubos. El anticuerpo primario se adsorbe o se une covalentemente a la superficie de la placa, perla o tubo, o se une indirectamente a través de una segunda 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 juntos o secuencialmente y se incuban en condiciones que permiten la competición por la unión del anticuerpo entre GHRsp en la muestra y el péptido marcado. El péptido marcado no unido se puede aspirar posteriormente y la placa se puede enjuagar, dejando el péptido marcado unido al anticuerpo unido a la placa. El péptido marcado puede medirse entonces usando las técnicas descritas anteriormente.

Los ensayos de tipo sándwich tienen mayor especificidad, velocidad y mayor intervalo de medición. En este tipo de ensayo, un exceso del anticuerpo primario contra un biomarcador del fragmento de GHRsp se une al pocillo de una placa de ELISA, perla o tubo mediante adsorción, acoplamiento covalente o un anticuerpo anti-Fc o gammaglobulina, como se describió anteriormente para los ensayos de unión competitiva en fase sólida. El fluido 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 generalmente rápida. Un segundo anticuerpo contra el biomarcador del fragmento de GHRsp también se incubaba con la muestra de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo se elige para unirse a un sitio en un biomarcador del fragmento de GHRsp que es diferente del sitio de unión del anticuerpo primario. Estas dos reacciones de anticuerpos dan como resultado el biomarcador del fragmento de GHRsp de la muestra intercalado entre los dos anticuerpos. El segundo anticuerpo normalmente se marca con un compuesto fácilmente medible como se detalla anteriormente para los ensayos de unión competitiva. Como alternativa, un tercer anticuerpo marcado que se une específicamente al segundo anticuerpo se puede poner en contacto con la muestra. Después de eliminar por lavado el material no unido, el anticuerpo marcado unido puede medirse y cuantificarse mediante métodos descritos para ensayos de unión competitiva.

También se puede usar un ensayo del tipo de tira reactiva. Estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Pueden, por ejemplo, emplear partículas pequeñas como oro o partículas de látex 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 que migre 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 atrapamiento, que contienen agentes de unión para las partículas, tales como antígenos o anticuerpos, a lo largo de la tira. La acumulación de las partículas coloreadas en estos sitios da como resultado el desarrollo del color que depende de la concentración del antígeno competidor en la muestra. Otros métodos de tira reactiva pueden emplear anticuerpos unidos covalentemente a tiras de papel o de membrana para atrapar el antígeno en la muestra. Las reacciones posteriores que emplean segundos anticuerpos acoplados a enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante y la incubación con sustratos para producir un flujo de luz de color, fluorescente o quimioluminiscente permitirán la cuantificación del antígeno en la muestra.

Como se discutió en los siguientes ejemplos, en un aspecto, el radioinmunoensayo (RIA) es la técnica de laboratorio utilizada. En un RIA, se emplea un antígeno radiomarcado y un antígeno no marcado en la 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 biomarcador del fragmento de GHRsp con un anticuerpo específico y la proteína de unión a un anticuerpo radiomarcado pueden medir la cantidad de anticuerpo

5 marcado en el precipitado como proporcional a la cantidad del biomarcador del fragmento de GHRsp en la muestra. Como alternativa, se produce un biomarcador del fragmento de GHRsp marcado y se usa una proteína de unión al anticuerpo no marcada. A continuación se añade una muestra biológica a analizar. La disminución en los recuentos del biomarcador del fragmento de GHRsp marcado es proporcional a la cantidad de biomarcador del fragmento de GHRsp en la muestra.

10 En el RIA también es factible separar los biomarcadores del fragmento de GHRsp unidos de los biomarcadores del fragmento de GHRsp libres. Esto puede implicar la precipitación del complejo biomarcador del fragmento de GHRsp/anticuerpo con un segundo anticuerpo. Por ejemplo, si el complejo biomarcador del fragmento de GHRsp/anticuerpo contiene anticuerpo de conejo, entonces se puede usar anticuerpo anti-conejo de burro para precipitar el complejo y se cuenta la cantidad de marcador. Por ejemplo, en un contador LKB Gammamaster. Véase Hunt PJ, et al., Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. Clin. Endocrinol. 1997 47:287-296.

15 Los métodos de la divulgación comprenden además medir los niveles de uno o más de otros marcadores de neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o una combinación de neumonía y ADHF que no son un biomarcador del fragmento de GHRsp. El nivel del otro marcador o marcadores se puede comparar con los niveles medios de control de una población de control. Una desviación en el nivel medido respecto al nivel de control medio es diagnóstico de neumonía. Los métodos de la divulgación se han descrito con respecto a niveles más altos o al aumento en los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp que son indicativos de neumonía. También se contemplan medidas de desviaciones por encima o por debajo de un nivel de control.

20 Los métodos de la divulgación también se han descrito con respecto a niveles más altos o al aumento en los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp que son indicativos de insuficiencia cardíaca aguda descompensada o indicativos de neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada. También se contemplan la medición de desviaciones por encima o por debajo de un nivel de control.

25 Correlacionar el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp con otros marcadores puede aumentar el valor predictivo, diagnóstico o de control de los biomarcadores del fragmento de GHRsp. En el caso de la neumonía, de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada o en un escenario donde un sujeto tiene tanto neumonía como insuficiencia cardíaca aguda descompensada, la combinación de los niveles de biomarcador del fragmento GHRs con biomarcadores conocidos de neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada puede aumentar el valor diagnóstico del resultado de un paciente.

30 Los ejemplos de biomarcadores conocidos de neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada incluyen, pero no se limitan a, proteína natriurética cerebral (BNP), NT-proBNP, proteína C-reactiva (CRP), nitrógeno ureico en sangre (BUN), procalcitonina (PCT), proteína de los cálculos pancreáticos y troponina.

35 El análisis de varios marcadores peptídicos se puede llevar a cabo simultáneamente o por separado usando una única muestra de prueba. Se prefieren los ensayos de formato simultáneo, de dos o múltiples sitios. Los sistemas multiplex de perlas, micromatriz o biochip son particularmente útiles. Las perlas, matrices o chips pueden tener varias ubicaciones discretas, a menudo direccionables, que comprenden un anticuerpo contra uno o más marcadores que incluyen GHRsp y fragmentos de GHRsp. El uno o más marcadores incluyen más de un biomarcador del fragmento de GHRsp. Por ejemplo, puede ser útil analizar los fragmentos del biomarcador del fragmento de GHRsp N-terminal y C-terminal y combinar los resultados del ensayo. También son factibles muchas otras combinaciones de marcadores. Los documentos US2005/0064511, patente US-6.019.944 y Ng e Ilang, J. Cell Mol. Med., 6: 329-340 (2002) proporcionan una descripción de micromatriz, chips, dispositivos capilares y técnicas útiles en la presente invención. Luminex proporciona un sistema multiplex de perlas útiles en la presente invención. Véase también The Protein Protocols Handbook, supra. Los analizadores de laboratorio adecuados para usar con ensayos separados o secuenciales incluyen AxSym (Abbott, EE. UU.), ElecSys (Roche), Access (Beckman), ADVIA CENTAUR® (Bayer) y el sistema de inmunoensayo Nichols Advantage® (Nichols Institute).

40 En un aspecto, se realizan ensayos simultáneos de una pluralidad de polipéptidos en una única superficie tal como un chip o matriz.

45 En otro aspecto, se realizan ensayos separados de uno o más marcadores no GHRsp y los resultados se cotejan o se combinan con los resultados del biomarcador del fragmento de GHRsp.

50 Cuando se va a controlar un sujeto, se pueden tomar varias muestras biológicas a lo largo del tiempo. El muestreo en serie permite medir los cambios en los niveles de los marcadores, en particular los biomarcadores del fragmento de GHRsp a lo largo del tiempo. El muestreo puede proporcionar información sobre el tiempo de inicio aproximado de un evento, la gravedad del evento, indicar qué regímenes terapéuticos pueden ser apropiados, la respuesta a los regímenes terapéuticos empleados o el pronóstico a largo plazo. El análisis se puede llevar a cabo en los puntos de atención, como ambulancias, consultorios médicos, en la presentación clínica, durante los ingresos hospitalarios, en pacientes ambulatorios o durante los exámenes de rutina de salud.

Los métodos de la divulgación también se pueden realizar junto con un análisis de uno o más factores de riesgo tales como, entre otros, la edad, el peso, el nivel de actividad física y los antecedentes familiares de los eventos. Los resultados de la prueba también se pueden usar junto con los métodos de la invención. Por ejemplo, pruebas de tolerancia a la glucosa, resultados de ECG y exploración clínica. Se puede usar un cambio estadísticamente significativo en el nivel circulante de GHRsp, junto con uno o más factores de riesgo adicionales o resultados de pruebas para diagnosticar, pronosticar o controlar con mayor precisión la afección del sujeto.

Los métodos de la presente memoria también pueden usarse como una guía para la terapia. Por ejemplo, qué terapias iniciar y cuándo, control de la terapia, detección de los efectos positivos o adversos de la terapia, y ajuste de los regímenes terapéuticos siempre y cuando se requiera dependiendo de los resultados. Esto puede mejorar los resultados a corto, mediano y largo plazo para los pacientes.

En otro aspecto, la divulgación proporciona GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), un nuevo péptido descubierto y aislado por los solicitantes. Por lo tanto, también se proporcionan péptidos GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) aislados y/o purificados (que incluyen GHRsp (1-10) humano (SEQ ID NO: 4) y variantes de especie de los mismos). También se incluyen agentes de unión a GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) que incluyen anticuerpos anti-GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) y fragmentos de unión a anticuerpos, ensayos de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) que incluyen inmunoensayos y su uso en la detección de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) en una muestra biológica, como se describe en la presente memoria. Los agentes de unión a GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) y los ensayos son útiles para diagnosticar, evaluar, controlar, etc., un evento o trastorno biológico que se correlaciona con la liberación de un fragmento de GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) en la circulación. Dichos eventos o trastornos incluyen neumonía, como se describe en la presente memoria, y pueden usarse para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, evaluación, estadificación, control, categorización y determinación de diagnósticos adicionales y regímenes de tratamiento en sujetos con neumonía o sospecha de neumonía.

Neumonía

Los solicitantes han demostrado que los niveles de biomarcador del fragmento de GHRsp están correlacionados con la infección por neumonía (Figura 4). Por lo tanto, los solicitantes han proporcionado un marcador temprano y específico útil para la neumonía. Esto permitirá el diagnóstico precoz de la neumonía y permitirá a un médico distinguir tales casos de otras infecciones, así como de otras causas de disnea. Esto acorta significativamente la ventana actualmente existente a la espera de otras pruebas. Por lo tanto, puede realizarse antes un diagnóstico y tratamiento más preciso, reduciendo la morbilidad y la mortalidad y proporcionando mejores resultados pronósticos. La prueba de GHRsp para acelerar el diagnóstico permite la pronta introducción del tratamiento. La eficacia del tratamiento también puede controlarse mediante pruebas repetidas y ajustar la terapia según corresponda.

La presencia del biomarcador del fragmento de GHRsp se detecta preferiblemente en la muestra uniendo el biomarcador del fragmento de GHRsp a un agente de unión tal como un anticuerpo, que incluye un anticuerpo de la invención y midiendo la presencia de la cantidad del biomarcador del fragmento de GHRsp unido.

Como se indicó anteriormente, los anticuerpos que se unen o se unen selectivamente a GHRsp que incluyen variantes antigénicas y fragmentos de los mismos, forman un aspecto adicional de la invención y los anticuerpos se pueden preparar mediante las técnicas discutidas anteriormente. Los anticuerpos son útiles en los métodos y ensayos de la invención.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un kit para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía en un sujeto, que comprende un agente de unión al biomarcador del fragmento de GHRsp (o agentes de unión para múltiples biomarcadores de los fragmentos de GHRsp) que incluye un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención. En un aspecto, cuando el kit se usa para el diagnóstico, la muestra biológica es obtenida de un sujeto y se pueden tomar y analizar periódicamente una o más muestras adicionales. El kit puede calibrarse para medir niveles de GHRsp en el intervalo de al menos aproximadamente 0,1 pmol/l, al menos aproximadamente 1 pmol/l, al menos aproximadamente 5 pmol/l, al menos aproximadamente 10 pmol/l, u otros niveles.

La calibración de los ensayos se puede efectuar de acuerdo con métodos de la técnica conocidos, por ejemplo, usando muestras de sangre con niveles conocidos de biomarcador del fragmento de GHRsp, o un conjunto de calibraciones con diferentes niveles conocidos de GHRsp en cada uno. Las tiras de prueba para su uso en kits de diagnóstico se calibran comúnmente durante la fabricación. Véase por ejemplo la patente US- 6.780.645. El kit es útil para medir el nivel del biomarcador del fragmento de GHRsp en una muestra biológica. Los reactivos de detección pueden ser secuencias oligonucleotídicas complementarias de GHRsp o un fragmento del marcador de GHRsp, o anticuerpos que se unen a los polipéptidos codificados por el marcador. Los reactivos se pueden unir a una matriz sólida como se discutió anteriormente o se pueden empaquetar con reactivos para unirlos a la matriz. La matriz o sustrato sólido puede estar en forma de perlas, placas, tubos, varillas de inmersión, tiras o biochips, todos ellos como se ha descrito anteriormente.

Los reactivos de detección incluyen reactivos de lavado y reactivos capaces de detectar anticuerpos unidos (tales como anticuerpos secundarios marcados) o reactivos capaces de reaccionar con el anticuerpo marcado.

El kit también puede incluir convenientemente un reactivo de control (positivo y/o negativo) y/o un medio para detectar el polipéptido o anticuerpo. También se pueden incluir instrucciones de uso con el kit, tales como el procedimiento para tomar una muestra biológica de un sujeto en las seis, cuatro o dos horas posteriores al inicio o presentación con neumonía, medir el nivel de GHRsp en la muestra, compararlo con un nivel de control y asociar el resultado con el estado de infección de neumonía. En general, un aumento en el nivel del marcador de GHRsp de un control es indicativo de neumonía.

Más habitualmente, los kits se formatearán para ensayos conocidos en la técnica, y en un aspecto para PCR, hibridación Northern, transferencia Southern o ELISA como se conocen en la técnica.

Los kits también pueden incluir uno o más ensayos adicionales (o instrucciones para el uso de ensayos adicionales) para dianas o marcadores indicativos de neumonía. Estos incluyen procalcitonina, receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1), proteína C reactiva, inmunoglobulinas y citocinas proinflamatorias. También pueden incluir uno o más biomarcadores del fragmento de GHRsp en combinación con un ensayo o ensayos de uno o más de coeptina, cortisol, endotoxina y/o proadrenomedulina. En un aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3). En otro aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3). En otro aspecto, el biomarcador del fragmento de GHRsp es GHRsp (1-9) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).

El kit estará compuesto por uno o más envases y también puede incluir un equipo de recolección, por ejemplo, botellas, bolsas (como bolsas de líquidos intravenosos), viales, jeringas y tubos de ensayo. Al menos un envase contiene un producto que es efectivo para diagnosticar o controlar la neumonía. El producto es habitualmente una molécula de ácido nucleico, polipéptido o un agente de unión, particularmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o una composición que comprende cualquiera de estos. En un aspecto preferido, una instrucción o etiqueta en, o asociada a, el contenedor indica que la composición se usa para diagnosticar o controlar la neumonía. Otros componentes pueden incluir agujas, diluyentes y tampones. De manera útil, el kit puede incluir al menos un envase que comprende un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa.

Los agentes de unión que se unen o se unen selectivamente a un biomarcador del fragmento de GHRsp (y opcionalmente un biomarcador del fragmento no GHRsp) se incluyen deseablemente en el kit. En un aspecto, 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 en un aspecto monoclonal o policlonal y se puede preparar en cualquier mamífero como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia nativa del péptido biomarcador del fragmento de GHRsp de la divulgación, por ejemplo, GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y/o GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4), o un péptido sintético basado en, o que incluye el mismo, o que puede producirse contra una secuencia exógena sola o fusionarse con otra secuencia.

En un aspecto del kit, se inmoviliza un reactivo de detección del biomarcador del fragmento de GHRsp en una matriz sólida tal como una tira o un chip poroso para formar al menos un sitio de detección del biomarcador del fragmento de GHRsp. La región de medición o detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios de detección, tales sitios de detección que contienen un reactivo de detección del biomarcador del fragmento de GHRsp. Los sitios pueden organizarse en una barra, cruz o punto u otra disposición. Una tira o chip de prueba también puede contener sitios para controles negativos y/o positivos. Los sitios de control pueden estar como alternativa en una tira o chip diferente. Los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos o anticuerpos inmovilizados, p.ej., una cantidad mayor en el primer sitio de detección y cantidades menores en sitios posteriores. Tras la adición de una muestra biológica de prueba, el número de sitios que muestran una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa o semicuantitativa de la cantidad de biomarcador del fragmento de GHRsp presente en la muestra.

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

Como alternativa, el dispositivo puede ser un dispositivo electrónico que permite la entrada, el almacenamiento y la evaluación de los niveles del marcador medido contra los niveles de control y otros niveles de marcador. La patente US 2006/0234315 proporciona ejemplos de tales dispositivos. También son útiles en la invención el Protein Chip® de Ciphergen que se puede usar para procesar los resultados de SELDI usando el paquete de software Protein Chip® de Ciphergen.

Insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF)

La insuficiencia cardíaca estable crónica puede descompensarse fácilmente y conducir a insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF). La ADHF representa un empeoramiento de los síntomas, generalmente dificultad

para respirar (disnea), edema y fatiga, en un paciente con una enfermedad cardíaca existente. Es una causa común y potencialmente grave de dificultad respiratoria aguda, y su signo clínico más sensible es la distensión venosa yugular. El péptido natriurético cerebral (BNP) es un biomarcador bien documentado y utilizado para el diagnóstico de ADHF, en el que los niveles elevados en la sangre en relación con un nivel de control o referencia son diagnósticos de esta afección.

Neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF)

La detección precisa y rápida de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) o la neumonía (o ambas) como causa de disnea es un problema importante y al que dedican mucho tiempo los médicos del servicio de urgencias y los médicos de cabecera. Esto se debe a que el diagnóstico inexacto o incompleto junto con el tratamiento incorrecto resultante puede ser mortal, debido a un tratamiento incorrecto o a retrasos en la implementación del tratamiento correcto.

Actualmente, no existe ningún biomarcador individual o panel de biomarcadores que pueda diagnosticar si un paciente tiene neumonía y ADHF. Esto es de vital importancia, ya que a menudo se pasa por alto el diagnóstico de neumonía en pacientes con una ADHF diagnosticada, una situación que compromete gravemente el tratamiento efectivo de dichos pacientes y puede ser mortal. Como se muestra en los ejemplos que siguen, los solicitantes son los primeros en demostrar la utilidad de los fragmentos de GHRsp como biomarcadores circulantes fiables y predecibles de neumonía y ADHF.

Se obtendrá una comprensión adicional de la invención por referencia a la siguiente sección experimental no limitativa que es ilustrativa y no pretende limitar la invención o las reivindicaciones de ninguna manera. Los datos apoyan el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria para diagnosticar, evaluar o controlar la neumonía en un sujeto.

Ejemplos

Métodos

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

Productos químicos

El péptido señal de la GHR humana sintético GHRsp (1-9), (SEQ ID NO: 3) fue sintetizado por Mimotopes (Australia) usando un método de síntesis en fase sólida Fmoc suave. Todos los reactivos tampón se adquirieron en BDH® (Reino Unido) y/o Sigma (Mo, EE. UU.). El GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) se sintetizó con el C-terminal extendido con cisteína para el acoplamiento del transportador direccional. El GHRsp (1-9) también se extendió C-terminalmente con un resto de tiosilo para la preparación del trazador en el mismo péptido.

Estudios en seres humanos

Para este estudio, se obtuvieron inicialmente muestras de sangre de 123 pacientes que acudieron al servicio de urgencias del Hospital de Christchurch con el síntoma principal de dificultad respiratoria/disnea.

Los pacientes eran elegibles para este estudio si tenían ≥ 18 años de edad y recibían atención aguda en el servicio de urgencias del Hospital de Christchurch debido al síntoma principal de dificultad para respirar. Se excluyeron los pacientes que no podían dar su consentimiento informado o si la dificultad respiratoria estaba claramente relacionada con un traumatismo (por ejemplo, lesión por aplastamiento o heridas penetrantes). De aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión y que otorgaron su consentimiento informado, se reunió la siguiente información: síntoma a la presentación, antecedentes médicos, exploración física con énfasis particular en hallazgos cardiovasculares y respiratorios, bioquímica y hematología de rutina y marcadores de daño cardíaco si lo solicita el servicio de urgencias, radiografía de tórax y ecocardiografía (si está disponible).

A continuación se extrajeron muestras de sangre en tubos sobre hielo y se centrifugaron a $+4$ °C a 2700 g durante 5 minutos y el plasma se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Extracción de plasma

Todas las muestras de plasma se extrajeron en cartuchos SepPak, (Waters, EE. UU.) como se describió previamente (Hunt PJ, et al., Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. Clin. Endocrinol. 1997 47:287-296), se secaron y se almacenaron a -20 °C antes del RIA y de la HPLC.

Análisis de concentración de hormonas

En las muestras de plasma se analizó el GHRsp medido por RIA específico de la siguiente manera:

5 RIA de GHRsp

Para la medición de péptidos de biomarcador del fragmento de GHRsp humano, se realizó un RIA dirigido contra los aminoácidos 1-9 (SEQ ID NO: 3) de la secuencia de señal de la preprorelina humana (1-23) (SEQ ID NO: 1).

10 Generación de anticuerpos

Se acopló la preproGHR (1-9)^{Cys10} a BSA derivatizado con éster de N-e-maleimidocaproiloxi succinimida (EMCS) tratado con maleimida en PBS (pH 7,0) mezclando suavemente a temperatura ambiente. El péptido acoplado se emulsionó con adyuvante de Freund (2 ml) y se inyectó por vía subcutánea (2 ml en total) en 2 conejos blancos de Nueva Zelanda en 4 a 5 sitios a intervalos mensuales. Los conejos se sangraron 12 días después de la inyección para evaluar los títulos de anticuerpos hasta que se lograron los niveles adecuados. Mediante RIA, se determinó GHRsp IR usando antisuero en una dilución final de 1:15.000. Este antisuero no tenía reactividad cruzada detectable con los péptidos y fármacos indicados en la Figura 3, incluidos 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 lo descrito en Klee, GG, Interference in hormone immunoassays Clin Lab Bed, 2004, 24:1-18.

25 Método de yodación y ensayo

El GHRsp (1-9)_{Tyr10} se yodó mediante el método de cloramina T y se purificó en HPLC de fase inversa (RP-HPLC) como se describió previamente. Brennan et al., "Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments" Science 229: 81-83 (1985). A partir de esta preparación, se ensayó una forma trazadora yodada por RP-HPLC. Todas las muestras, patrones, trazas radiactivas y soluciones de antisuero se diluyeron en tampón de ensayo a base de potasio. Hunt PJ, et al., Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. Clin. Endocrinol. 1997 47:287-296. El ensayo de incubación consistió en 100 µl de muestra o patrón (0-640 pmol de preproGHR humana (1-9) combinado con 100 µl de antisuero que se agitó en vórtice y se incubó a 4 °C durante 24 horas. A continuación se añadieron 100 µl de traza (4000-5000 cpm) y se incubó nuevamente durante 24 horas a 4 °C. Las inmunorreactividades libres y unidas se separaron finalmente mediante el segundo método de anticuerpo en fase sólida (anti-oveja de burro Sac-Cel®, IDS Ltd, Inglaterra) y se contaron en un contador Gammamaster (LKB, Uppsala, Suecia).

40 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como media ± EEM. Los datos de evolución temporal se analizaron usando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas seguido de una prueba *post-hoc* con una diferencia mínima significativa. El análisis de correlación de las concentraciones de hormona en plasma se llevó a cabo utilizando un modelo de regresión lineal general. En todos los análisis, un valor P < 0,05 se consideró significativo.

45 RESULTADOS

Para determinar si el fragmento de 1-9 aminoácidos del péptido señal de grelina está presente en la circulación de seres humanos, se usó un radioinmunoensayo (RIA) específicos dirigido contra los residuos 1-9 de la preprorelina (1-23). La dilución de extractos de plasma demuestra el paralelismo con la curva patrón (no se muestra). De los 123 pacientes iniciales evaluados, 23 tenían neumonía según lo determinado por el estudio clínico, radiografía de tórax y análisis de esputo confirmatorio para la cepa de *Pneumococcus*.

La mediana de las concentraciones plasmáticas de GHRsp (1-9) en los pacientes no infectados (sin neumonía) se determinaron como 8,8 pmol/l (n = 100). La mediana de las concentraciones plasmáticas de GHRsp (1-9) en los pacientes infectados (con neumonía) se determinaron como 11,1 pmol/l (n = 23). Una curva ROC de estos resultados se presenta en la Figura 4, con un AUC de 0,714 (P < 0,01).

De un total de 286 pacientes evaluados, 52 tenían infección por neumonía confirmada según lo determinado en el estudio clínico, la radiografía de tórax y el análisis confirmatorio del esputo para la cepa de *Pneumococcus*. Esto incluye los n = 23 pacientes del análisis inicial mencionado anteriormente (Figura 4).

Las concentraciones plasmáticas medias de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en los pacientes no infectados (sin neumonía) se determinaron como 11,1 pmol/l. La mediana de las concentraciones plasmáticas de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en los pacientes infectados (con neumonía) se determinaron como 17,8 pmol/l (n = 52). En la Figura 5 se presenta una curva ROC de estos resultados, con un AUC de 0,654 (P < 0,001).

Estos datos también revelan una especificidad del 85,2 % y una sensibilidad del 45,3 % con > 18,9 pmol/l para GHRsp en pacientes con infección por neumonía.

5 Además, de un total de 286 pacientes examinados, 117 tenían insuficiencia cardíaca aguda descompensada confirmada según lo determinado por el estudio clínico (por ejemplo, presencia de una distensión venosa yugular), así como la presencia de BNP en circulación a un nivel más alto que el nivel en una muestra de control o referencia.

10 Las concentraciones plasmáticas medias de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en los pacientes no afectados (es decir, sin insuficiencia cardíaca aguda descompensada) se determinaron nuevamente como 11,1 pmol/l. La mediana de las concentraciones plasmáticas de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en los pacientes con ADHF se determinaron como 16.1 pmol/l (n = 117). En la Figura 6 se presenta una curva ROC de estos resultados, con un AUC de 0,601 (P < 0,01).

15 Estos datos también revelan una especificidad del 82,3 % y una sensibilidad del 26,5 % con > 18,9 pmol/l para GHRsp en pacientes con descompensación aguda de la insuficiencia cardíaca.

20 Finalmente, de un total de 286 pacientes evaluados, en 8 se confirmó la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) según se determinó en el estudio clínico de rutina, la radiografía de tórax y el análisis confirmatorio de esputo para la cepa de *Pneumococcus* en el caso de infección por neumonía, y según se determina en el estudio clínico de rutina (p. ej. presencia de distensión venosa yugular), así como la presencia de BNP en la circulación en un nivel superior al nivel de una muestra de control o referencia, en el caso de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada.

25 La mediana de las concentraciones plasmáticas de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en los pacientes no infectados/no afectados (es decir, sin neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada) se determinaron como 11,1 pmol/l. La mediana de las concentraciones plasmáticas de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en aquellos pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada se determinaron como 19,75 pmol/l (n = 8). Una curva ROC de estos resultados se presenta en la Figura 6, con un AUC de 0,751 (P < 0,001).

30 Estos datos también revelan una especificidad del 80,6 % y una sensibilidad del 75,0 % con > 18,9 pmol/l para GHRsp en pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada.

35 También se muestra en las Figuras 6 y 7 las curvas ROC para la proteína C reactiva (CRP), un biomarcador de inflamación conocido. Con un AUC de ROC de 0,409 (P < 0,001) para la CRP con una especificidad de 74,2 % y una sensibilidad de 15.8 % en la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) para GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) con 31,5 mg/l, y un AUC de ROC de 0,561 (P < 0,001) para CRP con una especificidad de 78,4 % y una sensibilidad de 37,5 % en la neumonía y la ADHF para el GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) con 31,5 mg/l, comparativamente, estos datos demuestran la utilidad clínica superior de los fragmentos de GHRsp como biomarcador de la neumonía y de ADHF, así como de la ADHF.

40 A menos que se indique lo contrario, las concentraciones plasmáticas de GHRsp se midieron inmediatamente después de la presentación del paciente en el servicio de urgencias.

45 **Conclusión**

Estos son los primeros datos que prueban que los fragmentos peptídicos señal de la preprogrelina están presentes y significativamente elevados en la circulación de pacientes con neumonía. Con una medición del AUC de ROC de 0,714 (p < 0,01) (n = 23), los solicitantes demuestran que la medición de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre es útil como un biomarcador rápido de neumonía. Datos adicionales apoyan que GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) también se detectaba en sangre de pacientes con neumonía.

55 En la curva ROC, los resultados también muestran 83 % de especificidad/48 % de sensibilidad con 11,1 pmol/l y 92 % de especificidad/35 % de sensibilidad con 13,1 pmol/l. Estos datos confirman la idoneidad del ensayo del fragmento de GHRsp como una herramienta significativa para la toma de decisiones y que representa un buen nivel de utilidad clínica.

60 La importancia de estos datos se confirmó adicionalmente cuando la cohorte de pacientes se amplió para incluir un total de 286 pacientes evaluados, de los cuales n = 52 tenían infección confirmada por neumonía. Para evitar dudas, n = 52 con infección confirmada por neumonía incluye n = 23 de las mediciones iniciales. Con una medición del AUC de ROC de 0,654 (p < 0,001), una especificidad de 85,2 % y una sensibilidad de 45.3 % con > 18,9 pmol/l para GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3), los solicitantes demuestran además que la medición de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre es útil como un biomarcador rápido de neumonía.

65 Los solicitantes también presentan pruebas que demuestran que los fragmentos de péptido señal de la preprogrelina están presentes y significativamente elevados en la circulación de pacientes con insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), así como en pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada

(ADHF).

5 Con una medición del AUC de ROC de 0,601 ($P < 0,01$) ($n = 117$), una especificidad de 82,3 % y una sensibilidad de 26,5 % con $> 18,9$ pmol/l para GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3), los solicitantes demuestran que la medición de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre es útil como un biomarcador rápido de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF).

10 Además, con una medición del AUC de ROC de 0,751 ($P < 0,001$) ($n = 8$), una especificidad del 80,6 % y una sensibilidad del 75,0 % con $>18,9$ pmol/l para GHRsp (1-9), los solicitantes demuestran que la medición de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) en sangre es útil como biomarcador rápido de pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF).

15 Nuevamente, estos datos confirman además la idoneidad del ensayo del fragmento de GHRsp como una herramienta de toma de decisiones significativa que representa un buen nivel de utilidad clínica.

20 El aumento de los péptidos GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y (1-10) (SEQ ID NO: 4) en respuesta a la neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, y en pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada, respaldan su uso como biomarcadores para estas indicaciones. La medición de GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3) y GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4) también tiene potencial como marcadores de pronóstico y resultado a largo plazo en pacientes con neumonía, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, y en pacientes con neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada.

Los expertos en la materia apreciarán, por supuesto, que la descripción anterior se proporciona a modo de ejemplo y que la invención no se limita a la misma.

25 **Listado de secuencias**

<110> Pemberton *et al.*, Chris

30 <120> Biomarcadores

<130> OIL1014PC

<140> US 61/613.311

35 <141> 15-03-2013

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 1

ES 2 661 516 T3

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
115

5
 <210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala
20

10
 15
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> GHRsp (1-9)
 <400> 3

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser
1 5

25
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 661 516 T3

<220>
 <223> GHRsp (1-10)

5 <400> 4

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu
 1 5 10

<210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 5

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
 1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala
 20

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

20 <400> 6

Met Pro Ala Pro Arg Thr Ile Tyr Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Trp Met Asp Leu Ala Met Ala
 20

25 <210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

30 <400> 7

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Val Leu
 1 5 10 15

Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala
 20

35 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 8

ES 2 661 516 T3

Met Leu Ser Ser Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala
20

5
<210> 9
<211> 23
<212> PRT
<213> *Canis lupus*

<400> 9

Met Pro Ser Leu Gly Thr Met Cys Ser Leu Leu Leu Phe Ser Val Leu
1 5 10 15

Trp Val Asp Leu Ala Met Ala
20

10
<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> *Felis catus*

<400> 10

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Phe Ser Met Leu
1 5 10 15

Trp Ala Asp Leu Ala Met Ala
20

20
<210> 11
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> secuencia consenso de GHRsp (1-23)

<400> 11

30
Met Pro Ser Pro Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
1 5 10 15

Trp Met Ala Asp Leu Ala Met Ala
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el método realizar un método de ensayo configurado para detectar un fragmento de péptido señal de grelina de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 en una muestra de fluido corporal obtenida del sujeto para proporcionar un resultado del ensayo; y correlacionar el resultado del ensayo con la presencia o el estado de neumonía e insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en el sujeto.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
- 15 (a) dicha etapa de correlación comprende correlacionar el resultado del ensayo con uno o más de estratificación del riesgo, estadificación, clasificación y control de la existencia o el estado de neumonía y de ADHF en el sujeto; (b) dicha etapa de correlación comprende asignar un régimen de tratamiento al sujeto basándose en el resultado del ensayo;
- 20 (c) dicha etapa de correlación comprende evaluar un resultado clínico después de un régimen de tratamiento para la neumonía y la ADHF en el sujeto; y/o (d) dicho resultado del ensayo es una concentración medida de un fragmento de péptido señal de grelina, y dicha etapa de correlación comprende comparar dicha concentración con una concentración umbral.
- 25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que
- (a) el sujeto se selecciona para la evaluación de la neumonía basándose en uno o más síntomas de neumonía, incluida tos con producción de esputo, fiebre, derrame pleural, dolor torácico agudo en la inspiración y dificultad para respirar; y/o
- 30 (b) el sujeto se selecciona para la evaluación de la ADHF basándose en uno o más síntomas de la ADHF, incluyendo dificultad para respirar (disnea), edema y fatiga.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha etapa de correlación comprende evaluar si la neumonía y la ADHF mejoran o empeoran en el sujeto basándose en el resultado del ensayo.
- 35 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2(d), en el que el umbral es una concentración del fragmento del péptido señal de grelina:
- (a) obtenido del sujeto en un punto temporal anterior;
- (b) obtenido de una población de sujetos normales;
- (c) obtenido de una población que tiene neumonía y ADHF; y/o
- 40 (d) seleccionado para distinguir de una población de sujetos una primera subpoblación que tiene neumonía y ADHF con respecto a una segunda subpoblación que no tiene neumonía ni ADHF.
- 45 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho método de ensayo comprende un agente de unión al fragmento de péptido señal de grelina que se une a:
- (a) GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3); o
- (b) GHRsp (1-10) (SEQ ID NO: 4).
- 50 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el nivel del fragmento de péptido señal de grelina se detecta en la muestra uniendo un fragmento de péptido señal de grelina a un agente de unión que se une selectivamente a GHRsp (1-9) (SEQ ID NO: 3).
- 55 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que dicho agente de unión al fragmento de péptido señal de grelina es un anticuerpo policlonal, monoclonal, biespecífico, quimérico o humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 60 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el fragmento de péptido señal de grelina o el agente de unión se marcan con un marcador detectable.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra biológica procede de una fuente circulatoria, tal como sangre, plasma, suero, saliva, fluido intersticial u orina, o de una muestra de tejido.
- 65 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el nivel de fragmento de péptido señal de grelina se mide usando espectroscopía de masas, o usando un ensayo seleccionado de RIA, ELISA, ensayo inmunofluorométrico y ensayo inmunoradiométrico.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende además medir el nivel de uno o más marcadores no GHRsp de neumonía, ADHF o neumonía y ADHF, opcionalmente en el que el marcador no GHRsp se selecciona del grupo que consiste en procalcitonina (PCT), receptor desencadenante expresado en células mieloides-1, proteína C reactiva (CRP), inmunoglobulinas y citocinas proinflamatorias, proteína natriurética cerebral (BNP), N-terminal-proBNP (NT-BNP), nitrógeno ureico en sangre (BUN), proteína de los cálculos pancreáticos y troponina.

5

13. Un método de ensayo para detectar la neumonía y la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF) en un sujeto, comprendiendo el ensayo:

10

(a) unir un fragmento de péptido señal de grelina de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 obtenido a partir de o en una muestra biológica; y

(b) determinar la presencia o cantidad de fragmento de péptido señal de grelina unido; y

15

(c) correlacionar la presencia o cantidad de dicho fragmento de péptido señal de grelina unido con un valor de referencia o de control;

en el que una desviación en la presencia o cantidad de fragmento de péptido señal de grelina unido en la muestra respecto al valor de referencia o control es indicativo de que el sujeto tiene neumonía y ADHF.

20

14. Un método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 13, en el que:

(a) la cantidad de fragmento de péptido señal de grelina superior a la cantidad de control es indicativa de neumonía y ADHF;

25

(b) dicho método se usa para evaluar o controlar una respuesta al tratamiento de la neumonía y la ADHF en un sujeto, en el que un cambio en el nivel medido del fragmento del péptido señal de grelina respecto al nivel de control es indicativo de una respuesta al tratamiento; y/o

(c) el ensayo comprende medir el nivel del fragmento de péptido señal de grelina en múltiples muestras biológicas del sujeto.

Figura 1

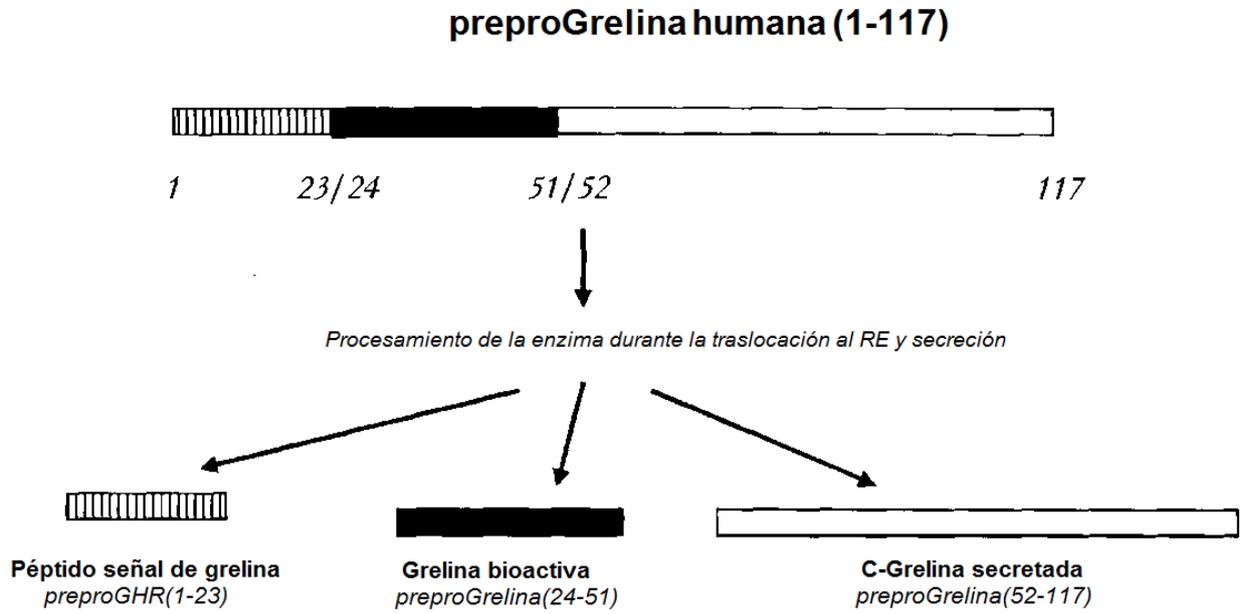


Figura 2

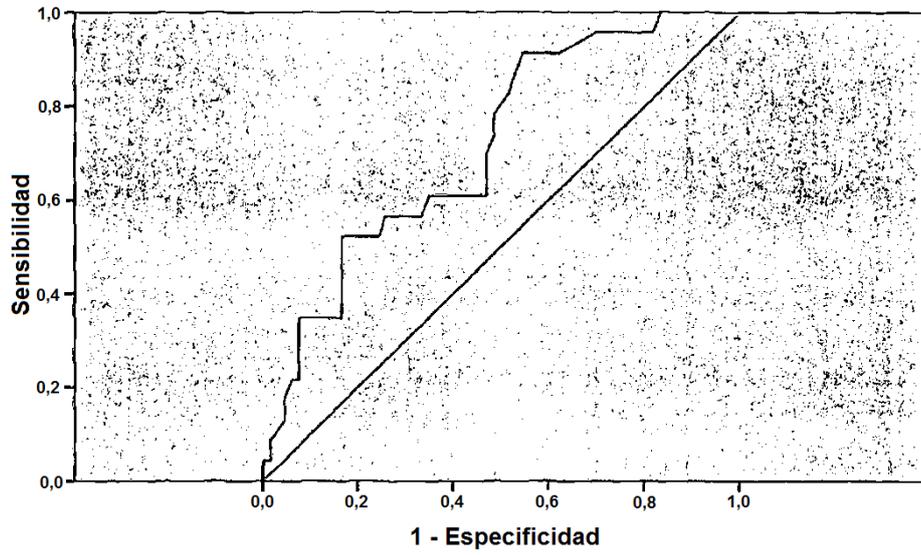
Rattus norvegicus	MVSSATICSLLLLSMLWM-DMAMA
Homo sapiens	MPSPGTVCSLLLLGMLWL-DLAMA
Ovis aries	MPAPRTIYSLLLLSLLWM-DLAMA
Sus scrofa	MPSTGTICSLLLLSVLLMADLAMA
Mus musculus	MLSSGTICSLLLLSMLWM-DMAMA
Canis lupus familiaris	MPSLGTMCSSLLLFVLWV-DLAMA
Felis catus	MPSPGTVCSLLLFSLWA-DLAMA
Consenso	MPSPGTICSLLLLSMLWMADLAMA

Figura 3

<u>Péptido</u>	<u>Reactividad cruzada con antisuero contra Ghr-SPn (1-9) (%)</u>
Ghr-SPn(1-9)	100
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 I	<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
Clopidogrel	0
Morfina	0
Aspirina	0

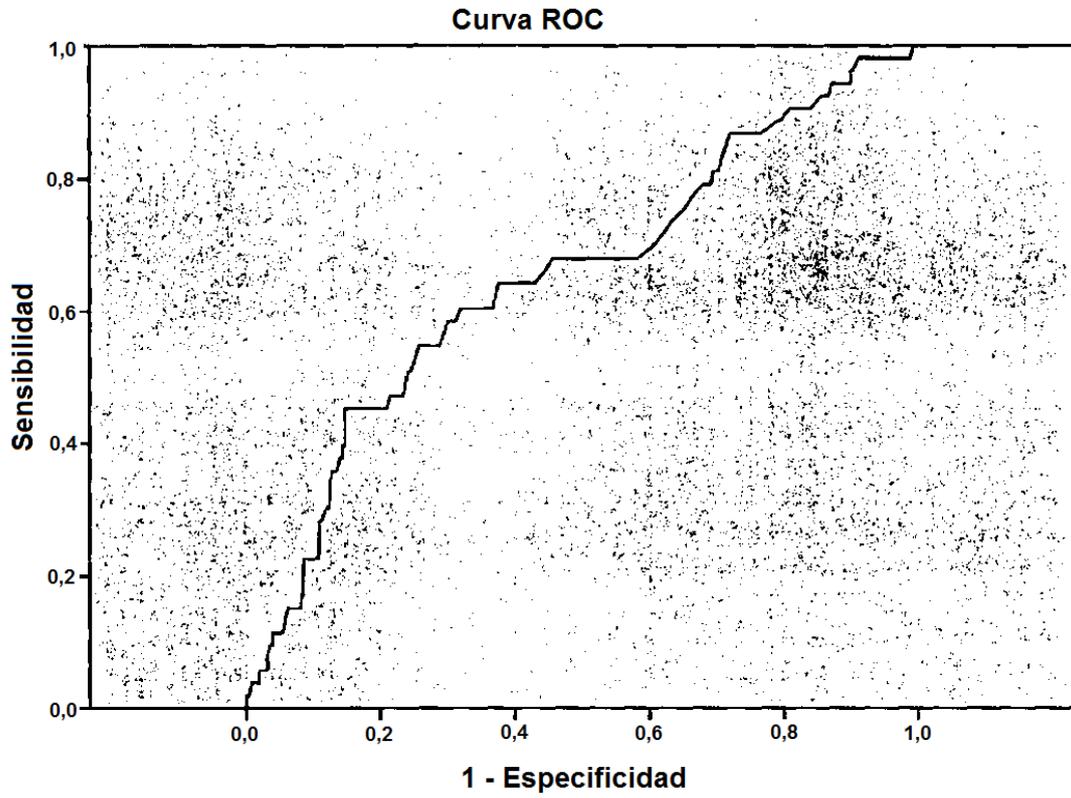
Figura 4

Curva ROC



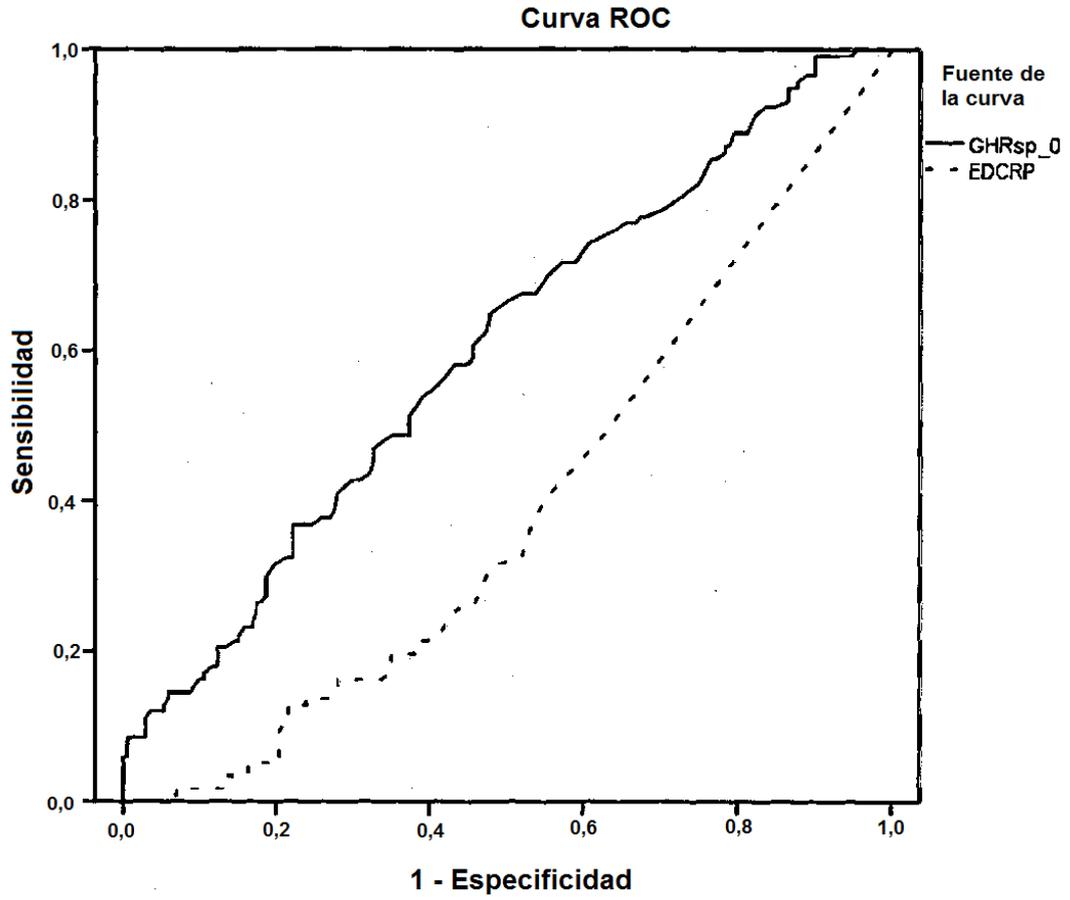
Los segmentos diagonales se obtienen uniendo valores

Figura 5



Los segmentos diagonales se obtienen uniendo valores

Figura 6



Los segmentos diagonales se obtienen uniendo valores

Figura 7

