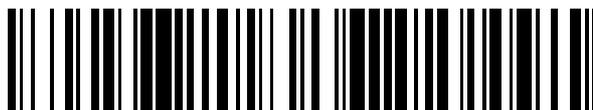


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 725**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2009 PCT/NZ2009/000031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO09113879**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009 E 09719459 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2265641**

54 Título: **Biomarcadores**

30 Prioridad:

12.03.2008 US 35770 P

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

07.05.2018

73 Titular/es:

**OTAGO INNOVATION LIMITED (100.0%)
87 St David Street, P.O. Box 56
Dunedin, NZ**

72 Inventor/es:

**PEMBERTON, CHRISTOPHER JOSEPH;
RICHARDS, ARTHUR MARK;
NICHOLLS, MICHAEL GARY y
YANDLE, TIMOTHY GRANT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 666 725 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 al péptido señal de insulina (INS-SP, del inglés *insulin signal peptide*) y a su uso en el pronóstico, el diagnóstico y el seguimiento de trastornos o estados de eventos biológicos que dan como resultado la liberación del marcador en la circulación. Incluyendo dichos eventos trastornos del manejo de la glucosa, diabetes y afecciones asociadas tales como las enfermedades cardiovasculares, trastornos cardíacos en particular agudos.

Antecedentes

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por deficiencias en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. Estas deficiencias dan como resultado una hiperglucemia crónica. La diabetes también tiene una serie de afecciones asociadas incluyendo la obesidad y un mayor riesgo de trastornos cardíacos, incluyendo las enfermedades cardiovasculares. La diabetes afecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo y se espera que se duplique en los próximos veinte años.

La diabetes se divide en dos tipos conocidos como diabetes de tipo 1 y diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 1 es un trastorno relacionado con la autoinmunidad en el que el sistema inmunitario del individuo actúa para destruir las células beta del páncreas. Los individuos con diabetes de tipo 1 generalmente son insulino dependientes. Presentan una secreción de insulina limitada, si es que presentan alguna.

La diabetes de tipo 2 es la forma más común, representando el 90 y el 95 % de los casos. La mayoría de los diabéticos de tipo 2 no son insulino dependientes, sino que presentan secreción de insulina y deficiencias en la acción de la insulina, lo que conduce a hiperglucemia. La hiperglucemia con frecuencia es leve con síntomas difíciles de reconocer. Como resultado, muchos diabéticos de tipo 2 permanecen sin diagnosticar durante muchos años. En un momento dado se estima que del 10 al 15 % de la población puede estar en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2, pero no están diagnosticados.

La diabetes se diagnostica más habitualmente basándose en el ensayo de tolerancia oral a la glucosa que evalúa el manejo de la glucosa. A los individuos se les proporciona una bebida de glucosa después de una noche de ayuno para someter a ensayo su tolerancia a la glucosa. El ensayo dura varias horas para medir las respuestas. Por desgracia, el ensayo de tolerancia a la glucosa y el ensayo de nivel de insulina en ayunas carecen de sensibilidad y presentan falsos positivos que limitan su utilidad como indicadores de pronóstico de la diabetes.

La diabetes es un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares, aumentando el riesgo de un episodio cardíaco de dos a tres veces. A pesar de la reconocida necesidad de herramientas de diagnóstico y pronóstico para evaluar el riesgo de un individuo de desarrollar diabetes, trastornos del manejo de la glucosa precursores y afecciones asociadas tales como enfermedades cardiovasculares, no existen ensayos simples y precisos disponibles. Es un objeto de la presente invención, en cierto modo, satisfacer estas necesidades y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

El diagnóstico precoz y las evaluaciones en curso de la diabetes y los trastornos del manejo de la glucosa precursores o cualquier otra forma de disglucemia o disinsulinemia, son importantes no solo para el tratamiento de la diabetes, sino también para tratar afecciones asociadas, tales como enfermedades cardiovasculares. Además de proporcionar métodos de detección precoz para afecciones, enfermedades asociadas a disglucemia o disinsulinemia, por ejemplo, la presente invención también tiene aplicaciones más amplias incluso en el ámbito cardiovascular.

Los trastornos cardíacos agudos, incluyendo los síndromes coronarios agudos (SCA) abarcan un amplio espectro de episodios isquémicos cardíacos que van desde la angina inestable hasta el infarto agudo de miocardio (IAM). El IAM se presenta como el más grave de estos episodios y, por tanto, requiere un diagnóstico rápido y preciso. Los pacientes que presentan dos o más de las características descritas (antecedentes de dolor torácico, cambios evolutivos en los trazos del electrocardiograma (ECG) en serie y un ascenso y descenso de los biomarcadores cardíacos plasmáticos) se identifican claramente como que padecen un IAM.²⁶ Sin embargo, una proporción significativa de pacientes (40 %-50 %) que presentan una sospecha de IAM no tienen cambios en serie en el ECG o síntomas típicos, lo que pone mucho énfasis, por tanto, en las concentraciones circulantes de biomarcadores para el diagnóstico preciso.^{26,27}

El diagnóstico preciso precoz de infarto de miocardio facilita la introducción inmediata de tratamiento por reperfusión, incluyendo la revascularización percutánea o trombolítica eficaz y la terapia anticoagulante y antiplaquetaria adyuvante. Dichos tratamientos son progresivamente menos eficaces en la reducción de la mortalidad y la morbilidad con cada hora de retraso en el diagnóstico y el tratamiento.^{2,4} Dada la necesidad de la toma de decisiones acelerada en esta situación clínica, existe la necesidad de una identificación de biomarcadores

circulantes que proporcione un diagnóstico precoz y específico de trastornos cardíacos agudos, en particular, IAM, por ejemplo.

5 De hecho, las directrices clínicas actuales ponen de relieve la importancia de la medición de biomarcadores en la identificación del infarto de miocardio y los síndromes coronarios agudos.²⁶ Se ha propuesto una serie de biomarcadores para este propósito, incluyendo creatina cinasa-MB (CK-MB), troponina T (TnT), troponina I (TnI) BNP, N-BNP (también conocido como NP-BNP), péptido señal de BNP (BNP-SP) y mioglobina, pero existen limitaciones para su uso. El tiempo hasta la elevación detectable o anormal de los biomarcadores cardíacos plasmáticos puede ser de 6 horas (mioglobina, CK-MB) a 12 horas (TnT, TnI, BNP, N-BNP), no produciéndose los niveles máximos hasta 24-48 horas después de la aparición de la lesión, imponiendo una ventana de retraso en el diagnóstico y el tratamiento precisos.¹⁻⁴ Además, tanto la mioglobina como la CK-MB son inespecíficos y pueden secretarse a partir de fuentes extracardíacas, especialmente durante un traumatismo o una cirugía.¹

15 Chang et al., *Tissue Antigens*, Volumen 62, N.º 5, noviembre de 2003, páginas 408-417 desvela una estrategia para identificar ligandos de moléculas de clase I de antígeno leucocitario humano (HLA) basada en un ensamblaje *in vitro* mediado por biblioteca peptídica moléculas de clase I recombinantes. Se usaron péptidos de la biblioteca para iniciar el ensamblaje de HLA-B8, HLA-B15 y HLA-A2 recombinantes, facilitando la identificación de candidatos epítomos de linfocitos T candidatos a partir de proinsulina.

20 El documento WO2006007667 se refiere en general al campo de la inmunoterapia y el inmunodiagnóstico de afecciones autoinmunitarias. El documento WO2006007667 desvela específicamente agentes que son reconocidos por, o son específicos para, linfocitos T sensibilizados por proinsulina o insulina y contempla el uso de estos agentes en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico para la diabetes de tipo 1.

25 Los poderes de diagnóstico/predictivos a largo plazo de los marcadores conocidos, por tanto, carecen del poder adjunto de un marcador específico para proporcionar el diagnóstico precoz específico de trastornos cardíacos agudos, tales como la lesión cardíaca aguda dentro de las primeras horas de la presentación clínica. Todavía existe una necesidad del mismo para los marcadores precoces.

30 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un marcador precoz de trastornos cardíacos agudos y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

Sumario de la invención

35 El péptido señal de insulina humano (INS-SP, del inglés *insulin signal peptide*) es un péptido de 24 aminoácidos escindido de la proinsulina (preproinsulina) (1-110) SEQ ID NO: 1. El procesamiento de la insulina humana se muestra en la Figura 4. El INS-SP (1-24) se muestra por separado en la SEQ ID NO: 14.

40 Los solicitantes han descubierto por primera vez que se liberan INS-SP y fragmentos del mismo en la circulación. Se identifican y proporcionan biomarcadores circulantes útiles. Anteriormente se pensaba que el INS-SP solo se producía intracelularmente.²⁵

45 Basándose en este hallazgo, los solicitantes proporcionan en un aspecto de la invención un método para predecir, diagnosticar, evaluar o controlar un acontecimiento biológico o trastorno en un sujeto en el que el episodio o trastorno se correlaciona con la liberación de uno o más biomarcadores INS-SP en la circulación, comprendiendo el método medir el nivel de uno o más biomarcadores INS-SP en una muestra tomada o derivada del sujeto, y analizar el nivel junto con un respectivo intervalo de valores de referencia para dicho uno o más biomarcadores.

50 La presente invención proporciona un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno aislado que se une al fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16.

La presente invención también proporciona el uso de un fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 en la preparación de un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno.

55 La presente invención también proporciona un ensayo para un fragmento de péptido señal de insulina en una muestra de sangre, plasma o suero de un sujeto, comprendiendo el ensayo medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 en la muestra usando un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención.

60 La presente invención también proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento biológico o trastorno en un sujeto en el que el episodio o trastorno se correlaciona con la liberación de un fragmento de péptido señal de insulina en la circulación, comprendiendo el método:

65 (a) medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina (1-9), como se muestra en la SEQ ID NO: 16, en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto; y

(b) comparar el nivel de fragmento de péptido señal de insulina con el nivel de fragmento de péptido señal de insulina de un individuo sano de control, en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control es indicativa de un acontecimiento biológico o trastorno; y en el que

5 el trastorno es un síndrome coronario agudo (SCA) y un nivel medido de fragmento de péptido señal de insulina superior al nivel de control es indicativo de SCA.

La presente invención también proporciona un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno que se une al fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 para su uso en el diagnóstico de un síndrome coronario agudo SCA en un sujeto.

La presente invención también proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar el síndrome coronario agudo (SCA) que comprende un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno que se une al fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 e instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar el síndrome coronario agudo (SCA) en un sujeto a partir del nivel de fragmento de péptido señal de insulina medido en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto.

En una realización preferida, el fragmento de INS-SP es INS-SP humano (1-9) (SEQ ID NO: 16).

20 En otro aspecto, el método comprende comparar el nivel de un biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una o más muestras tomadas o derivadas del sujeto con el nivel de biomarcador INS-SP de un control en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control es indicativa de un acontecimiento biológico o trastorno.

25 En un sujeto diabético, tal como un sujeto diabético de tipo 1, o en un sujeto con otra disglucemia resultante de niveles de secreción de insulina deprimidos, el nivel de insulina será diferente del normal, al igual que los niveles de INS-SP y/o fragmento de INS-SP. Este hallazgo indica que el INS-SP es útil como marcador para dichas afecciones. Dependiendo del estado de insulina del sujeto, los niveles de biomarcador INS-SP en el sujeto serán superiores o inferiores al normal.

30 En un sujeto diabético, tal como un sujeto diabético de tipo 2, o en un sujeto con otra disinsulinemia, el nivel de insulina será diferente del normal, al igual que los niveles de INS-SP y/o fragmento de INS-SP. Este hallazgo indica que INS-SP y/o fragmentos de INS-SP también son útiles como marcador para dichas afecciones, así como en otros estados hiperinsulinémicos tales como el síndrome metabólico. Dependiendo del estado de insulina del sujeto, los niveles de biomarcador INS-SP en el sujeto serán superiores o inferiores al normal.

35 En consecuencia, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para predecir, diagnosticar, evaluar o supervisar la diabetes o el potencial diabético, así como otras afecciones caracterizadas por disglucemia y/o disinsulinemia, comprendiendo el método medir el nivel de uno o más biomarcadores INS-SP en una muestra tomada o derivada del sujeto, y analizar el nivel junto con un respectivo intervalo de valores de referencia para dichos uno o más biomarcadores.

40 En otro aspecto, el método comprende comparar el nivel de un biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una o más muestras tomadas o derivadas del sujeto con el nivel de biomarcador INS-SP de un control en el que un nivel medido de INS-SP que se desvía del nivel de control es indicativo de diabetes o de una predisposición a la diabetes u otra afección asociada a disglucemia y/o disinsulinemia. En una realización el nivel de biomarcador INS-SP puede ser inferior al control.

45 La divulgación también proporciona un método de evaluación del manejo de la glucosa en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en un sujeto después de la administración de glucosa; y

50 (b) comparar el nivel de dicho INS-SP con el INS-SP de un control,

en el que una desviación en el nivel medido de INS-SP con respecto al nivel de control es indicativa de un trastorno del manejo de la glucosa.

60 Los solicitantes también han descubierto sorprendentemente que la concentración circulante de biomarcadores INS-SP es más alta en las primeras horas después de la aparición o en la presentación clínica con sospecha de síndrome coronario agudo (SCA). Los máximos están en el orden de cinco a quince veces superior a las poblaciones de control normales en estas primeras horas.

65 En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un

biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el nivel de INS-SP y/o fragmento de INS-SP de un control o valor o intervalo de valores de referencia en el que un nivel medido del biomarcador INS-SP superior al nivel de control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado, es indicativo de SCA.

5 La divulgación también proporciona un método para controlar una respuesta al tratamiento de un trastorno cardíaco agudo (TCA) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una muestra biológica tomada o derivada del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el nivel de biomarcador INS-SP de un control o valor o intervalo de valores de referencia, en el que un cambio en el nivel medido del biomarcador INS-SP con respecto al nivel de control o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado, es indicativo de una respuesta al tratamiento.

15 En otro aspecto, la divulgación también proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un episodio de rechazo de trasplante cardíaco en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una muestra biológica tomada o derivada de un sujeto después de un trasplante de corazón y comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el nivel de biomarcador INS-SP de un control o valor o intervalo de valores de referencia, en el que un nivel medido del biomarcador INS-SP superior al nivel de control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado, es indicativo de rechazo de trasplante o un episodio de rechazo de trasplante.

20 La divulgación también proporciona un método para distinguir entre un trastorno pulmonar y un trastorno cardíaco agudo (TCA) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una muestra biológica tomada o derivada del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el nivel de biomarcador INS-SP de un control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado, en el que un nivel medido del biomarcador INS-SP superior al nivel de control, o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado, es indicativo de TCA.

30 La invención también proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA), en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador INS-SP, preferentemente un fragmento de INS-SP, en una muestra biológica tomada o derivada del sujeto aproximadamente a las dos primeras horas de la aparición o la presentación clínica con SCA, comparar el nivel medido del biomarcador INS-SP con el nivel de biomarcador INS-SP de un control, o valor o intervalo de valores de referencia, en el que un nivel medido del biomarcador INS-SP superior al nivel de control o un valor o intervalo de valores de referencia predeterminado, es indicativo de SCA.

35 En un aspecto más amplio, los hallazgos del solicitante pueden usarse para predecir, diagnosticar, evaluar o controlar cualquier episodio en el que INS-SP o un fragmento de INS-SP, se libera en la circulación.

40 En un aspecto de los métodos cardíacos de la invención, el nivel de biomarcador INS-SP se mide una o más veces en muestras (o derivados de muestras) tomadas de un sujeto aproximadamente a las seis horas, aproximadamente cuatro horas, aproximadamente dos horas, aproximadamente una hora, aproximadamente 30 minutos o aproximadamente a los 15 minutos de la presentación del trastorno o su aparición. Se incluyen en la invención mediciones simples o múltiples de biomarcadores INS-SP a las seis horas, cuatro horas, dos horas, una hora, una hora y media y un cuarto de hora. También se incluyen mediciones de biomarcadores INS-SP o mediciones de biomarcadores INS-SP adicionales en muestras tomadas o derivadas posteriormente de un sujeto después de seis horas.

En una realización, los métodos de la invención son métodos *in vitro*.

50 En una realización, la muestra es sangre, plasma o suero. En una realización preferida, la muestra es sangre o plasma.

En una realización, la etapa de medición comprende detectar la unión entre INS-SP y un agente de unión que se une selectivamente a INS-SP. La etapa de medición en una realización comprende:

- 55
- (a) unir el biomarcador INS-SP con un agente de unión; y
 - (b) medir el nivel de biomarcador INS-SP unido.

60 El agente de unión en una realización es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Más habitualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, policlonal, biespecífico, quimérico o humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En otra realización, los niveles de un biomarcador INS-SP se miden usando espectroscopía de masas.

65

El biomarcador INS-SP que se une al anticuerpo o es detectado por el anticuerpo es INS-SP (1-9) (SEQ ID NO: 16). El anticuerpo puede unirse al fragmento INS-SP.

5 Los péptidos antigénicos específicos a los que se une selectivamente el agente de unión incluyen INS-SP humano (1-9) (SEQ ID NO: 16) o fragmentos de unión a antígeno o variantes de los mismos.

La unión del biomarcador INS-SP en un aspecto se mide usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se inmovilizan sobre una fase sólida.

10 Los niveles de un biomarcador INS-SP pueden medirse útilmente con un ensayo seleccionado entre RIE, ELISA, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico, espectrometría de masas y análisis inmunorradiométrico.

En consecuencia, la invención también proporciona un ensayo para un biomarcador INS-SP en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo el ensayo medir el nivel del biomarcador INS-SP en la muestra o derivado de muestra usando un anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona un ensayo para un biomarcador INS-SP que comprende:

- 20 (a) unir el biomarcador INS-SP de una muestra; y
(b) medir el nivel de biomarcador INS-SP unido.

El biomarcador INS-SP puede unirse usando un agente de unión a biomarcador INS-SP de la invención.

25 La divulgación también proporciona un ensayo de biomarcador INS-SP para su uso en la predicción, el diagnóstico, la evaluación o el control de un acontecimiento biológico o trastorno en un sujeto.

En una realización, el ensayo es un ensayo *in vitro*.

30 Los métodos relacionados con disglucemia de la divulgación pueden comprender adicionalmente medir el nivel de uno o más marcadores de no-INS-SP/fragmento de INS-SP de, por ejemplo, diabetes y comparar los niveles frente a niveles de marcadores con respecto a un control en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control de marcador de no-INS-SP, junto con un nivel medido de INS-SP que se desvía o es inferior al nivel de control de INS-SP es predictiva o diagnóstica de, por ejemplo, diabetes o puede usarse para controlar la diabetes, por ejemplo. Los marcadores de no-INS-SP/fragmento de INS-SP para la diabetes pueden incluir glucosa, insulina, lactato y niveles de triglicéridos o ácidos grasos o marcadores de los mismos. Otros marcadores incluyen HbA1c y fructosamina.

40 Los métodos cardíacos de la invención pueden comprender adicionalmente medir el nivel de uno o más marcadores de no-INS-SP o fragmento de no INS-SP de dicho SCA, y comparar los niveles frente a niveles de marcadores con respecto a un valor de control o referencia o intervalo de valores, en los que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control o referencia del marcador no-INS-SP, junto con un nivel medido del biomarcador INS-SP que es superior a un nivel de biomarcador INS-SP de control o de referencia, es predictiva o diagnóstica del SCA.

45 Los marcadores para su uso en el contexto de un síndrome coronario agudo incluyen troponina, troponina T, troponina I, creatina cinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP, BNP-SP, fragmentos de BNP-SP, ANP, ANP-SP, fragmentos de ANP-SP, LDH, aspartato aminotransferasa, proteína de unión de ácidos grasos específica del corazón (H-FABP), albúmina modificada por isquemia, endotelina, adrenomedulina y angiotensina II.

50 En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un agente de unión a biomarcador INS-SP. En una realización, el agente de unión a biomarcador INS-SP de la divulgación se une o detecta:

- (a) INS-SP (1-24) SEQ ID NO: 14;
- 55 (b) INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16;
- (c) INS-SP (15-24) SEQ ID NO: 18;
- 60 (d) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 19; o
- (e) una variante o fragmento de uno cualquiera de (a) a (d).

65 El agente de unión es útil para predecir, diagnosticar, evaluar o controlar un acontecimiento biológico o trastorno que se correlaciona con la liberación de un INS-SP o fragmento de INS-SP en la circulación. Dichos episodios o trastornos incluyen diabetes, trastornos de manejo de la glucosa y síndrome coronario agudo (SCA) en un sujeto.

En un aspecto, el agente de unión es un anticuerpo anti-INS-SP o un anticuerpo anti-fragmento de INS-SP o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los dos.

5 La invención también proporciona un anticuerpo de biomarcador anti-INS-SP o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a INS-SP 1-9 (SEQ ID NO: 16).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal, biespecífico, quimérico o humanizado, o fragmentos de unión o construcciones de cualquiera de ellos.

10 La divulgación también se refiere al uso de un agente de unión a biomarcador INS-SP en la fabricación de un ensayo de biomarcador INS-SP para evaluar un acontecimiento biológico o trastorno en un sujeto o para el uso de un agente de unión a biomarcador INS-SP en la fabricación de una herramienta de pronóstico, diagnóstico, evaluación o control para un acontecimiento biológico o trastorno en un sujeto. En un aspecto, el acontecimiento o trastorno se correlaciona con la liberación de INS-SP y/o un fragmento de INS-SP en la circulación incluyendo un trastorno del
15 manejo de la glucosa, diabetes o un trastorno cardíaco agudo (TCA).

La invención también se refiere a un método de uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención en la fabricación de una herramienta de pronóstico, diagnóstico o control para SCA que se correlaciona con la liberación de INS-SP y/o un fragmento de INS-SP en la circulación.

20 En una realización, la herramienta de pronóstico, diagnóstico o control se calibra para medir los niveles de INS-SP en el intervalo de aproximadamente 40 a 250 pmol/l.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar SCA en un sujeto, comprendiendo el kit un agente de unión a biomarcador INS-SP de la invención.

En una realización, el kit se calibra para medir niveles de biomarcador INS-SP en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 pmol/l, de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 pmol/l o de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 pmol/l.

30 En una realización, el kit también incluye instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar SCA en un sujeto, a partir del nivel de biomarcador INS-SP medido en una muestra de sangre, plasma o suero.

35 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento de INS-SP de la invención en la que dicho ácido nucleico se selecciona entre

(a) SEQ ID NO: 17 o una variante o fragmento de la misma;

40 (b) SEQ ID NO: 19 o una variante o fragmento de la misma;

(c) una secuencia que tiene al menos el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia a (a) o (b);

45 (d) una secuencia de al menos 10 nucleótidos de longitud, capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con cualquiera de (a) a (c); y

(e) un complemento de uno cualquiera de (a) a (d)

a condición de que la secuencia no sea la SEQ ID NO: 15.

50 En un aspecto, el fragmento de INS-SP codificada por la molécula de ácido nucleico es INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16 o INS-SP (15-24) SEQ ID NO: 18.

55 La divulgación también proporciona una construcción genética que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. En un aspecto, la construcción genética es una construcción de expresión. También se proporciona por la divulgación un vector que comprende la construcción genética, una célula hospedadora que comprende la construcción genética o vector, un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención, un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido de la invención y un método para producir de forma recombinante un polipéptido de la invención.

60 En consecuencia, en otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido aislado de biomarcador INS-SP o una variante o fragmento del mismo seleccionado entre

(a) INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16 o una variante o fragmento de la misma;

65

(b) INS-SP (15-24) SEQ ID NO: 18 o una variante o fragmento de la misma;

(c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de aminoácidos con (a) o (b), y

(d) un polipéptido INS-SP codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención.

La divulgación también se refiere a un uso de un polipéptido de la invención en la preparación de un anticuerpo anti-biomarcador INS-SP.

Un método para producir de forma recombinante un polipéptido de la invención comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula hospedadora que comprende una construcción genética de la invención capaz de expresar un polipéptido de la invención;

(b) seleccionar células que expresan el polipéptido de la invención;

(c) separar el polipéptido expresado de las células; y opcionalmente

(d) purificar el polipéptido expresado.

En un aspecto, el método comprende una pre-etapa de transfección de las células hospedadoras con la construcción.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con referencia a las figuras en los dibujos adjuntos en los que

FIGURAS

La **Figura 1** es un gráfico de barras que muestra concentraciones de biomarcador INS-SP circulante en pacientes derivado de una fuente cardíaca.

La **Figura 2** muestra los resultados de un radioinmunoensayo que muestra concentraciones de biomarcador INS-SP (círculos rellenos) en plasma procedente de pacientes con IAM (n = 9) en los tiempos indicados desde el ingreso hospitalario. Los niveles más altos de biomarcador INS-SP se observaron en la admisión, siendo algunos de 5 a 15 veces más altos en promedio que los niveles medidos en individuos sanos normales;

La **Figura 3** muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que el biomarcador Insulina-SPn plasmático inmunorreactivo, a diferencia de la insulina en sí, se reduce significativamente en voluntarios sanos normales mediante la ingestión oral de 75 g de glucosa, un ensayo habitual para determinar la sensibilidad a la insulina y su liberación con carga metabólica.

La **Figura 4** es un diagrama esquemático que esboza el procesamiento de proinsulina humana que da como resultado la generación de señal de libre, péptido C y cadenas de insulina α y β .

La **Figura 5** muestra un alineamiento de consenso para péptidos señal de insulina de ratón, gato, oveja, cerdo, ser humano y rata.

DEFINICIONES

El trastorno cardíaco agudo (TCA) incluye, pero no se limita a: síndromes coronarios agudos, incluyendo infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST en la presentación del ECG, angina inestable e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST; isquemia cardíaca; lesión cardíaca aguda; daño cardíaco agudo resultado de toxicidad aguda por fármacos, cardiomiopatías agudas y rechazo de trasplante cardíaco. Se encuentran definiciones descriptivas completas de estos trastornos en la referencia 1.

TCA/trastorno pulmonar se refiere a un sujeto con un TCA o trastorno pulmonar no diagnosticada o sospecha del mismo.

Los síndromes coronarios agudos (SCA) abarcan un amplio espectro de episodios de isquemia cardíaca incluyendo angina inestable, infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST en la presentación del electrocardiograma (ECG) e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST en el ECG.

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 ella. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye ampliamente anticuerpos de longitud completa y puede incluir también ciertos fragmentos de anticuerpos 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 se han madurado por afinidad. Un anticuerpo se une selectivamente o específicamente a un polipéptido de INS-SP de la invención si el anticuerpo que se une preferentemente al INS-SP, por ejemplo, tiene menos del 25 % o menos del 10 % o menos del 1 % o menos del 0,1 % de cruzada reactividad con un polipéptido no-INS-SP. Por lo general, el anticuerpo tendrá una afinidad de unión (valor de constante de disociación (Kd)), para el antígeno o epítipo de no más de 10^{-6} o 10^{-7} M o menos de 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 convencional.

Como se usa en el presente documento, un "fragmento de unión a antígeno" o "fragmento de anticuerpo" significa una porción del anticuerpo intacto que conserva la unión normal del anticuerpo del que deriva el antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos multiespecíficos.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que es un anticuerpo altamente específico dirigido contra un único antígeno diana. Un anticuerpo monoclonal puede obtenerse a partir de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos en los que cada anticuerpo monoclonal es idéntico y/o se une al mismo epítipo, a excepción de mutaciones naturales que pueden producirse en cantidades menores.

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, incluyendo enzimas y hormonas. En una realización, el anticuerpo se purifica al menos al 95 % o al 96 % o al 97 % o al 98 % o al 99 % en peso de anticuerpo. La pureza puede determinarse mediante el método de Lowry, por ejemplo. Normalmente el anticuerpo se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión "agente de unión", como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material sólido o no sólido capaz de unirse a INS-SP o un fragmento o variante del mismo. En una realización, el término se refiere a cualquier molécula natural o no natural que se une a INS-SP o un fragmento o variante del mismo. Los ejemplos de agentes de unión incluyen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y compuestos de molécula pequeña. Un agente de unión selectivo o específico es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Muestra o muestra biológica como se usa en el presente documento significa cualquier muestra tomada o derivada de un sujeto que se ha de explorar. La muestra puede ser cualquier muestra conocida en la técnica en la que pueda detectarse el biomarcador INS-SP. Se incluyen cualquier fluido corporal tal como plasma, sangre, saliva, fluido intersticial, suero, orina, fluido sinovial, cerebrospinal, linfa, fluido seminal, fluido amniótico, fluido pericárdico y ascitis, así como tejidos, tales como tejidos cardíacos, pero no se limitan a los mismos.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina y/o receptor de linfocitos T. Es decir, un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. Los determinantes epitópicos consisten por lo general en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas y características de carga específicas. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, 5 o por lo general 8-10 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario.

La expresión "a las seis horas de la aparición o presentación clínica" incluye desde 1 minuto hasta e incluyendo 360 minutos desde la aparición o la presentación en una instalación médica, por ejemplo, con TCA, rechazo de trasplante cardíaco o un TCA/trastorno pulmonar no diagnosticado o que se sospecha. Pueden hacerse mediciones a las 4 horas (desde 1 minuto hasta e incluyendo 240 minutos), a las 2 horas (desde 1 minuto hasta e incluyendo 120 minutos) o 1 hora (desde 1 minuto hasta e incluyendo 60 minutos) desde la aparición o la presentación, a los 5 a 45 minutos, 15 a 40 minutos, 20 a 35 minutos o a los 25 a 30 minutos de la aparición o presentación.

Un nivel "superior" o "inferior" a un valor de control o referencia, o un cambio, diferencia o desviación desde un valor de control o referencia en una realización es estadísticamente significativo. Un nivel superior, nivel inferior, diferencia o desviación desde o cambio desde un nivel de control o referencia, o significa que puede considerarse que existe un nivel de control o referencia si el nivel difiere del nivel de control o referencia en aproximadamente un 5 % o más, en aproximadamente un 10 % o más, en aproximadamente un 20 % o más o en aproximadamente un 50 % o más, en comparación con el nivel de control o referencia. Puede calcularse estadísticamente significativo, como alternativa, como $P \leq 0,05$. En una alternativa adicional, pueden determinarse niveles superiores, niveles inferiores, desviación y cambios mediante el recurso a límites de referencia del ensayo o intervalos de referencia. Estos pueden calcularse a partir de la evaluación intuitiva o métodos no paramétricos. En general, estos métodos calculan los

fractiles 0,025 y 0,975 como $0,025 * (n + 1)$ y $0,975 (n + 1)$. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica.^{22,23} La presencia de un marcador (incluyendo INS-SP) ausente en un control, por ejemplo, también se contempla como un nivel superior, desviación o cambio. La ausencia de un marcador (incluyendo INS-SP) presente en un control también se contempla como un nivel inferior, desviación o cambio.

5 Se incluyen muestras tomadas o derivadas de cualesquiera sujetos tales como de sujetos sanos normales sin historial clínico de acontecimientos biológicos o trastornos, incluyendo trastornos del manejo de la glucosa, diabetes o TCA y sujetos con diversos TCA incluyendo pero no limitados a síndromes coronarios agudos: (IAM) con elevación del segmento ST en la presentación del ECG, angina inestable e IM agudo sin elevación del segmento ST; isquemia
10 cardíaca; lesión cardíaca aguda; daño cardíaco agudo resultado de la toxicidad aguda por fármacos, cardiomiopatías agudas y rechazo de trasplante cardíaco.

El término "cardiomiopatías" como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades del miocardio donde se debilita el miocardio o músculo cardíaco. Esto puede dar como resultado una reducción de bombeo del corazón.

15 Las causas más comunes de cardiomiopatías son los ataques cardíacos, infecciones víricas, presión arterial alta, alcoholismo y enfermedades autoinmunitarias.

20 Un acontecimiento biológico o trastorno como se usa en el presente documento se refiere a una gama de episodios en los que un biomarcador INS-SP se libera en la circulación de un sujeto, incluyendo afecciones tanto agudas como crónicas. Las afecciones de ejemplo incluyen trastornos metabólicos tales como obesidad, diabetes, enfermedad renal, un trastorno del manejo de la glucosa incluyendo síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia y resistencia a la insulina; enfermedad no alcohólica del hígado graso (incluyendo esteatohepatitis no alcohólica) y enfermedad del hígado graso (incluyendo la hepatopatía alcohólica), enfermedades cardiovasculares
25 (incluyendo TCA tales como, pero no limitadas a, el síndrome coronario agudo). Son ejemplos de afecciones crónicas la diabetes y las enfermedades cardiovasculares.

30 El término INS-SP se refiere al péptido señal de INS completo de 24 aminoácidos para la secuencia de preproinsulina humana (1-110) (SEQ ID NO: 1). INS-SP (1-24) se muestra por separado en la SEQ ID NO: 14. Los biomarcadores INS-SP incluyen INS-SP, así como derivados de INS-SP o polipéptidos relacionados con INS-SP que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una variante o fragmento de INS-SP. Los fragmentos útiles como biomarcadores INS-SP incluyen INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16 e INS-SP (15-24) SEQ ID NO: 18. En una realización INS-SP actúa como un polipéptido de señal o como un polipéptido antigénico al que puede unirse un anticuerpo. Las variantes y fragmentos de INS-SP incluyen variantes y fragmentos que conservan al menos la
35 función antigénica.

40 La expresión "que comprende" como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones presentes, significa "que consiste al menos en parte en"; es decir, cuando se interpretan declaraciones en la memoria descriptiva y las reivindicaciones presentes que incluyen "que comprende", las características precedidas por este término en cada declaración necesitan estar todas presentes, pero también pueden estar presentes otras características. Términos relacionados, tales como "comprende" y "comprendido" deben interpretarse de manera similar.

45 El término "diabetes" como se usa en el presente documento abarca tanto la diabetes de tipo 1 (diabetes mellitus) como la de tipo 2. La diabetes de tipo 1 se define como un estado de hiperglucemia crónica. Un nivel de glucosa en ayunas en plasma venoso de más de $7,0^{\circ}\text{mmol/l}$ y/o un valor superior a $11,1^{\circ}\text{mmol/l}$ 2 horas después de un ensayo de tolerancia a la glucosa, o en una muestra al azar es indicativo de diabetes de tipo 1 (véase *Oxford Textbook of Medicine*, Warrell et al; 4ª Ed, 2005, P317).

50 La expresión "trastorno del manejo de la glucosa" como se usa en el presente documento incluye diversos estados de hiper e hipoglucemia (incluyendo el síndrome metabólico). Los estados hiperglucémicos incluyen una intolerancia a la glucosa alterada (TGA) y una glucosa en ayunas alterada (GAA). Un nivel de glucosa en ayunas en plasma venoso de menos de $7,0^{\circ}\text{mmol/l}$ y el valor de ensayo de tolerancia a la glucosa a las 2 horas de entre $7,8$ y $11,1^{\circ}\text{mmol/l}$ es indicativo de TGA. Los niveles de glucosa en ayunas de $6,1$ a $6,9^{\circ}\text{mmol/l}$ son indicativos de GAA (véase *Oxford Textbook of Medicine*, citado anteriormente).

55 La expresión "ensayo de tolerancia a la glucosa" como se usa en el presente documento se refiere al bien conocido ensayo de glucosa que se administra habitualmente después de ayunar por un sujeto que bebe 75 g de glucosa anhidra disuelta en 250 ml de agua (véase *Oxford Textbook of Medicine*, citado anteriormente).

60 El término "polinucleótido" o "polinucleótidos", como se usa en el presente documento, significa un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido mono o bicatenario de cualquier longitud e incluye como ejemplos no limitantes, secuencias codificantes y no codificantes de un gen, secuencias sentido y antisentido, exones, intrones, ADN genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNip, ARNmi, ARNt, ribozimas, polinucleótidos recombinantes, secuencias de ADN o de ARN de origen natural aisladas y purificadas, secuencias de ARN y ADN sintéticas, sondas
65 de ácidos nucleicos, cebadores, fragmentos, construcciones genéticas, vectores y polinucleótidos modificados. La referencia a una molécula de ácido nucleico ha de entenderse de manera similar.

Un "fragmento" de una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que es susceptible de hibridación específica con una diana de interés, por ejemplo, una secuencia que tiene al menos 10 nucleótidos de longitud. En una realización, los fragmentos de la invención comprenden al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 o 71, nucleótidos contiguos de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 15. Un fragmento de una secuencia polinucleotídica puede usarse como un cebador, una sonda, incluirse en una micromatriz o usarse en métodos de selección basados en polinucleótidos en el presente documento. Fragmentos de otros polinucleótidos de la invención (tales como la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19) o polinucleótidos que se describen en el presente documento deben entenderse de manera similar. Por ejemplo, fragmentos de INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 17 e INS-SP (15-24) SEQ ID NO: 19 tienen al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19, respectivamente.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido corto, por lo general que tiene un grupo 3'OH libre, que se hibrida con un molde y se usa para cebar la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana.

El término "sonda" se refiere a un polinucleótido corto que se usa para detectar una secuencia polinucleotídica, que es complementaria a la sonda, en un ensayo basado en hibridación. La sonda puede consistir en un "fragmento" de un polinucleótido como se define en el presente documento.

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, abarca cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo secuencias de longitud completa en las que los restos de aminoácidos están unidos mediante enlaces covalentes. Los polipéptidos útiles en la presente invención pueden ser productos naturales purificados o pueden producirse parcial o totalmente usando técnicas recombinantes o sintéticas. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento de polipéptido, una variante de polipéptido o derivado de los mismos. Los polipéptidos en el presente documento pueden tener longitudes de cadena de al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23 o los 24 aminoácidos de la proteína INS-SP de longitud completa (SEQ ID NO: 14). La referencia a otros polipéptidos de la invención (tales como la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18) u otros polipéptidos descritos en el presente documento debe entenderse de manera similar.

Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la actividad biológica o unión y/o proporciona la 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 de polipéptido o derivado de los mismos. En una realización, el fragmento es capaz de realizar la actividad del péptido señal anterior o conserva las propiedades de unión a antígeno de INS-SP (1-24), INS-SP (1-9) o INS-SP (15-24), u otro polipéptido de la invención o polipéptido que se describe en el presente documento.

El término "aislado" como se aplica a las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos que se desvelan en el presente documento se usa para referirse a secuencias que se retiran de su entorno celular natural. Una molécula aislada puede obtenerse mediante cualquier método o combinación de métodos, incluyendo técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas. Las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas pueden prepararse mediante al menos una etapa de purificación.

El término "purificado" como se usa en el presente documento no requiere pureza absoluta. Purificado se refiere en una realización al menos al 90 % o al 95 % o al 98 % o al 99 % de homogeneidad de un polinucleótido, anticuerpo polipeptídico o célula hospedadora en una muestra. El término debe entenderse de manera similar en relación con otras moléculas y construcciones que se describen en el presente documento.

El término "aislado" como se aplica a una célula o célula hospedadora describe una célula o célula hospedadora que se ha obtenido o retirado de un organismo o de su entorno natural y se mantiene posteriormente en un entorno de laboratorio como se conoce en la técnica. El término no se limita a células individuales, en sí, sino que se refiere a una célula o célula hospedadora comprendida en un cultivo celular y puede incluir una sola célula o una sola célula hospedadora.

El término "recombinante" se refiere a una secuencia polinucleotídica que se retira de secuencias que la rodean en su contexto natural y/o se recombina con secuencias que no están presentes en su contexto natural.

Una secuencia polipeptídica "recombinante" se produce mediante la traducción de una secuencia polinucleotídica "recombinante".

Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas diferentes de las secuencias identificadas específicamente, en las que de uno a 18 o más nucleótidos

y de 1 a 6 o más restos de aminoácidos se suprimen, se sustituyen o se añaden. Se contemplan específicamente sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos. También se contemplan sustituciones, adiciones o deleciones de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos. Las variantes pueden ser variantes alélicas de origen natural o variantes de origen no natural. Las variantes pueden ser de la misma o de otras especies y pueden abarcar homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polipéptidos útiles en la invención tienen actividades biológicas que incluyen la actividad de péptido señal o propiedades de unión a antígeno que son iguales o similares a las de los polipéptidos o polinucleótidos parentales. El término "variante" con referencia a polinucleótidos y polipéptidos abarca todas las formas de polinucleótidos y polipéptidos como se definen en el presente documento.

Las secuencias polinucleotídicas variantes presentan al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con una secuencia de la presente invención. Se encuentra identidad sobre una ventana de comparación de al menos 10 posiciones de nucleótidos, al menos 15 posiciones de nucleótidos, al menos 20 posiciones de nucleótidos, al menos 27 posiciones de nucleótidos, al menos 40 posiciones de nucleótidos, al menos 50 posiciones de nucleótidos, al menos 60, al menos 65 o al menos 70 posiciones de nucleótidos o en la longitud completa de un polinucleótido de SEQ ID NO: 15. Para otros polinucleótidos desvelados en el presente documento. La identidad puede determinarse de manera similar. Por ejemplo, para la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19 la ventana de comparación puede tener al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones de nucleótidos.

La identidad de secuencia polinucleotídica puede calcularse en toda la longitud de la superposición entre un candidato y secuencias polinucleotídicas sujeto usando programas de alineamiento global de secuencia (por ejemplo, Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Una implementación completa del algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch se encuentra en el programa de aguja en el paquete EMBOSS (Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. *EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics*, Junio de 2000, vol 16, N.º 6, páginas 276-277) que puede obtenerse de <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>. El servidor del Instituto Europeo de Bioinformática también proporciona la prestación para realizar alineaciones globales EMBOSS-aguja entre dos secuencias en línea en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>.

Como alternativa, puede usarse el programa GAP que calcula un alineamiento global óptimo de dos secuencias sin penalizar huecos terminales. GAP se describe en el siguiente trabajo: Huang, X. (1994) *On Global Sequence Alignment (Computer Applications in the Biosciences* 10, 227-235).

Las variantes polinucleotídicas también abarcan las que presentan una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que puede conservar la equivalencia funcional de estas secuencias y que no podría esperarse razonablemente que se hubieran producido aleatoriamente. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada una de dichas regiones notifica un "valor E", que es el número esperado de veces que uno podría esperar ver una coincidencia de este tipo por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijado que contiene secuencias aleatorias. El tamaño de esta base de datos está configurado por defecto en el programa bl2seq. Para valores de E pequeños, mucho menores que uno, el valor de E es aproximadamente la probabilidad de una coincidencia aleatoria de este tipo.

Las secuencias polinucleotídicas variantes presentan preferentemente un valor de E inferior a 1×10^{-5} , inferior a 1×10^{-6} , inferior a 1×10^{-9} , inferior a 1×10^{-12} , inferior a 1×10^{-15} , inferior a 1×10^{-18} o inferior a 1×10^{-21} cuando se compara con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

La identidad y similitud de secuencias polinucleotídicas también pueden determinarse de la siguiente manera. La secuencia polinucleotídica sujeto se compara con una secuencia polinucleotídica candidata usando algoritmos de alineamiento de secuencia y herramientas de búsqueda de similitud de secuencias como en GenBank, EMBL, Swiss-PROT y otras bases de datos. *Nucleic Acids Res* 29: 1-10 y 11-16, 2001 proporciona ejemplos de recursos en línea.

El uso de BLASTN se prefiere para el uso en la determinación de la identidad de secuencia para variantes polinucleotídicas de acuerdo con la presente invención.

BLASTN (del paquete de programas BLAST, versión 2.2.18 de abril de 2008 en bl2seq (Tatiana A. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 174: 247-250 (1999), Altschul et al., *Nuc. Acis. Res.* 25: 3389-3402, (1997)), está disponible públicamente de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) o de NCBI en Bethesda, Maryland, EE.UU. Se usan los parámetros por defecto de bl2seq, excepto porque el filtrado de partes de baja complejidad debe estar apagado.

La identidad de secuencias polinucleotídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros en línea de comandos UNIX:

`bl2seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p blastn`

5 El parámetro -F F apaga el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. El programa bl2seq notifica la identidad de secuencia como el número y el porcentaje de nucleótidos idénticos en una línea "Identidades =".

10 Como alternativa, los polinucleótidos variantes son polinucleótidos que se hibridan con la secuencia polinucleotídica especificada o un complemento de la misma en condiciones rigurosas.

15 La expresión "hibridar en condiciones rigurosas" y equivalentes gramaticales de la misma, se refiere a la capacidad de una molécula de polinucleótido para hibridarse con una molécula de polinucleótido diana (tal como una molécula de polinucleótido diana inmovilizada sobre una transferencia de ADN o ARN, tal como una transferencia Southern o una transferencia Northern) en condiciones definidas de temperatura y concentración de sal. La capacidad de hibridar en condiciones de hibridación rigurosas puede determinarse hibridando inicialmente en condiciones menos rigurosas y después aumentando la rigurosidad a la rigurosidad deseada.

20 Con respecto a moléculas de polinucleótido mayores de aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación rigurosas típicas no son superiores a 25 a 30 °C (por ejemplo, 10 °C) por debajo de la temperatura de fusión (Tf) del dúplex nativo (véase, en general, Sambrook et al., Editores, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, que se incorpora en el presente documento por referencia). La Tf para moléculas de polinucleótido de más de aproximadamente 100 bases puede calcularse mediante la fórmula $T_f = 81,5 + 0,41 \% (G + C - \log (Na^+))$ (Sambrook et al., Editores, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton y McCarthy, 1962, *PNAS* 84: 1390). Condiciones rigurosas típicas para un polinucleótido de más de 100 bases de longitud serían condiciones de hibridación tales como prelavado en una solución de SSC 6X, SDS al 0,2 %; hibridación a 65 °C, SSC 6X, SDS al 0,2 % durante la noche, seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC 1X, SDS al 0,1 % a 65 °C y dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 65 °C.

35 En un aspecto condiciones rigurosas usan formamida al 50 %, SSC 5 x, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonidos (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado que comprende SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

40 Con respecto a moléculas de polinucleótido que tienen una longitud inferior a 100 bases, son condiciones de hibridación rigurosas de ejemplo de 5 a 10 °C por debajo del Tf. En promedio, la Tf de una molécula de polinucleótido de longitud inferior a 100 pb se reduce en aproximadamente (500/longitud del oligonucleótido) °C.

45 Con respecto a los miméticos de ADN conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (ANP) (Nielsen et al., *Science*. 6 de diciembre de 1991; 254 (5037): 1497-500) los valores de Tf son superiores a los de los híbridos de ADN-ADN o ADN-ARN y pueden calcularse usando la fórmula descrita en Giesen et al., *Nucleic Acids Res.*, 1 de noviembre de 1998; 26 (21): 5004-6. Son condiciones de hibridación rigurosas de ejemplo para un híbrido de ADN-ANP que tiene una longitud de menos de 100 bases de 5 a 10 °C por debajo de la Tf.

50 Los polinucleótidos variantes también abarcan polinucleótidos que difieren de las secuencias de la invención pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que tiene actividad similar a un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Una alteración de la secuencia que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido es una "variación silenciosa". Excepto por ATG (metionina) y TGG (triptófano), pueden cambiarse otros codones para el mismo aminoácido mediante técnicas reconocidas en la técnica, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones en un organismo hospedador particular.

55 También se incluyen en la invención alteraciones de la secuencia polinucleotídica que dan como resultado sustituciones conservadoras de uno o varios aminoácidos en la secuencia polipeptídica codificada, sin alterar significativamente su actividad biológica. Un experto en la materia será consciente de métodos para hacer sustituciones de aminoácidos fenonormalmente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie et al., 1990, *Science* 247, 1306).

60 Pueden determinarse polinucleótidos variantes debidos a variaciones silenciosas y sustituciones conservadoras en la secuencia polipeptídica codificada usando el programa bl2seq a través del algoritmo de tblastx como se ha descrito anteriormente.

65 El término "variante" con referencia a polipéptidos también abarca polipéptidos de origen natural, producidos de forma recombinante y sintética. Las secuencias polipeptídicas variantes presentan preferentemente al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 100 %.

al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con una secuencia de la presente invención. La identidad se encuentra sobre una ventana de comparación de al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, posiciones de aminoácidos o en toda la longitud de un polipéptido de la SEQ ID NO: 14 o de otros polipéptidos desvelados o usados en la invención. Por ejemplo, para la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18 la ventana de comparación puede ser de al menos 5, 6, 7, 8 o 9 posiciones de aminoácidos o en toda la longitud del polipéptido.

Las variantes polipeptídicas también abarcan aquellas que presentan una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que puede preservar la equivalencia funcional de estas secuencias y que no se podía esperarse razonablemente que se hubieran producido aleatoriamente. Como se ha analizado anteriormente, en el caso de variantes de INS-SP la función puede ser, ya sea como un polipéptido señal o polipéptido antigénico o ambos.

La identidad y la similitud de la secuencia polipeptídica pueden determinarse de la siguiente manera. La secuencia polipeptídica sujeto se compara con una secuencia polipeptídica candidata mediante BLASTP (del paquete de programas BLAST, versión 2.2.18 [abril de 2008]) en bl2seq, que está disponible públicamente de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Los parámetros por defecto de bl2seq se usan excepto porque el filtrado de regiones de baja complejidad debe apagarse.

La similitud de secuencias polipeptídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros en línea de comandos UNIX:

```
bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp
```

El parámetro -F F apaga el filtrado de secciones de baja complejidad. El -p parámetro selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada una de dichas regiones notifica un "valor E", que es el número esperado de veces que uno podría esperar ver una coincidencia de este tipo por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijado que contiene secuencias aleatorias. Para valores de E pequeños, muy inferiores a uno, esta es aproximadamente la probabilidad de una coincidencia aleatoria de este tipo.

Las secuencias polipeptídicas variantes presentan habitualmente un valor E inferior a 1×10^{-5} , inferior a 1×10^{-6} , inferior a 1×10^{-9} , inferior a 1×10^{-12} , inferior a 1×10^{-15} , inferior a 1×10^{-18} o inferior a 1×10^{-21} cuando se compara con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

La identidad de secuencia polipeptídica también puede calcularse sobre toda la longitud de la superposición entre un candidato y secuencias polipeptídicas sujeto usando programas de alineamiento de secuencia global. EMBOSS-aguja (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) *On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences* 10, 227-235.) como se han analizado anteriormente son también programas de alineamiento de secuencias globales adecuados para calcular la identidad de secuencia polipeptídica.

El uso de BLASTP como se ha descrito anteriormente se prefiere para su uso en la determinación de variantes polipeptídicas de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto las variantes incluyen péptidos cuya secuencia difiere del INS-SP humano (1-24) SEQ ID NO: 14, INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16 o INS-SP (15-24) SEQ ID NO:18 en el presente documento por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sustituciones, deleciones o adiciones o inserciones conservadoras o no conservadoras de aminoácidos. Las mutaciones conservadoras no afectan a la actividad biológica del péptido. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparragina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. También pueden encontrarse ejemplos de sustituciones conservadoras en las secuencias de INS-SP como se muestra en los listados de secuencias mediante los que se muestran las sustituciones en diferentes especies de mamíferos en comparación con la secuencia humana. Otras sustituciones conservadoras pueden tomarse de la Figura 5 y de la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Resto original	Sustituciones conservadoras de ejemplo	Otras sustituciones
Ala (A)	val; leu; ile	ser, thr, gln, his, arg
Arg (R)	lys; gln; asn	his
Asn (N)	gln; his; lys; arg	
Asp (D)	glu	lys, ala

Resto original	Sustituciones conservadoras de ejemplo	Otras sustituciones
Cys (C)	ser	
Gln (Q)	asn	
Glu (E)	asp	
Gly (G)	pro; ala,	ile, glu
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	pro
Lys (K)	arg; gln; asn	
Met (M)	leu; phe; ile,	thr, val
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	
Trp (W)	tyr; phe	leu
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	

Los restos naturales se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- 5 (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- 10 (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- 15 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

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

25 Las sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones pueden hacerse mediante métodos de mutagénesis conocidos en la técnica. Un experto en la materia será consciente de los métodos para hacer sustituciones de aminoácidos fenonormalmente silenciosas. Véase, por ejemplo, Bowie et al., 1990, *Science* 247, 1306.⁹, Kunkel, T.; 1985, *PNAS*, 85 página 488.²⁷

30 También se incluyen dentro de los polipéptidos de la invención aquellos que se han modificado durante o después de la síntesis, por ejemplo, mediante biotilación, bencilación, glicosilación, fosforilación, amidación, mediante derivatización usando grupos bloqueantes/protectores y similares. Dichas modificaciones pueden aumentar la estabilidad o la actividad del polipéptido. Dichas modificaciones son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y Ausubel (citado anteriormente) y Lundblad, R, CRC Press, 1995.²⁸

35 La expresión "construcción genética" se refiere a una molécula de polinucleótido, generalmente ADN bicatenario, que puede haber insertado en él otra molécula de polinucleótido (la molécula de polinucleótido de inserción) tal como, pero no limitada a, una molécula de ADNc. Una construcción genética puede contener los elementos necesarios que permiten la transcripción de la molécula de polinucleótido de inserción, y, opcionalmente, la traducción del transcrito en un polipéptido. La molécula de polinucleótido de inserción puede derivar de la célula hospedadora o puede derivar de una célula u organismo diferente y/o puede ser un polinucleótido recombinante. Una vez dentro de la célula hospedadora la construcción genética puede llegar a integrarse en el ADN cromosómico del hospedador. La construcción genética puede estar unida a un vector.

45 El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido, generalmente ADN bicatenario, que se usa para el transporte de la construcción genética en una célula hospedadora. El vector puede ser susceptible de replicación en al menos un sistema hospedador adicional, tal como *E. coli*.

La expresión "construcción de expresión" se refiere a una construcción genética que incluye los elementos necesarios que permiten la transcripción de la molécula de polinucleótido de inserción, y, opcionalmente, la traducción del transcrito en un polipéptido. Una construcción de expresión comprende normalmente en una dirección 5' a 3':

- 5 (a) un promotor funcional en la célula hospedadora en la que se transformará la construcción,
- (b) el polinucleótido que se ha de expresar, y
- 10 (c) un terminador funcional en la célula hospedadora en la que se transformará la construcción.

La expresión "región codificante" o "marco de lectura abierto" (ORF, del inglés *open reading frame*) se refiere a la cadena sentido de una secuencia de ADN genómico o una secuencia de ADNc que es capaz de producir un producto de transcripción y/o un polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La secuencia codificante se identifica por la presencia de un codón de inicio de la traducción 5' y un codón de parada de la traducción 3'. Cuando se inserta en una construcción genética, una "secuencia codificante" es capaz de expresarse cuando está unida operativamente a secuencias de promotoras y terminadoras y/u otros elementos reguladores.

20 "Elementos reguladores" y "elementos reguladores polinucleotídicos" significan cualquier elemento que controla o influye en la expresión de un inserto polinucleotídico a partir de un vector, construcción genética o casete de expresión e incluye promotores, secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, elementos reguladores específicos de tejido, elementos reguladoras temporales, potenciadores, señales de poliadenilación, represores y terminadores. Los elementos reguladores pueden ser homólogos o heterólogos para el inserto de polinucleótido que se ha de expresar a partir de un vector, construcción genética o casete de expresión de acuerdo con la invención.

30 "Homólogo", como se usa en el presente documento con referencia a la relación entre un elemento regulador polinucleotídico (PRE, del inglés *polynucleotide regulatory element*) y la secuencia a la que el PRE se une operativamente en una construcción genética significa que el PRE normalmente se asocia en naturaleza con la secuencia de codificación a la que está unido operativamente en la construcción. Un elemento regulador polinucleotídico homólogo puede unirse operativamente a un polinucleótido de interés, de manera que el polinucleótido de interés puede expresarse a partir de un vector, construcción genética o casete de expresión de acuerdo con la invención.

35 "Heterólogo", como se usa en el presente documento con referencia a la relación entre un elemento regulador polinucleotídico (PRE) y la secuencia a la que el PRE se une operativamente en una construcción genética significa que el PRE normalmente no se asocia en naturaleza con la secuencia de codificación a la que está unido operativamente en la construcción. Dichos PRE pueden incluir promotores que normalmente se asocian a genes diferentes (distintos de INS), y/o promotores aislados de cualquier otra célula bacteriana, vírica, eucariota o de mamífero.

45 "Unido operativamente" significa que la secuencia que se ha de expresar se pone bajo el control de elementos reguladores que incluyen promotores, secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, elementos reguladores específicos de tejido, elementos reguladores temporales, potenciadores, señales de poliadenilación, represores y terminadores.

50 La expresión "región no codificante" se refiere a secuencias no traducidas que están corriente arriba del sitio de inicio de la traducción y corriente abajo del sitio de parada de la traducción. Estas secuencias también se denominan respectivamente como el UTR 5' y el UTR 3'. Estas regiones incluyen elementos necesarios para el inicio de la transcripción y terminación y para la regulación de la eficiencia de la traducción.

55 Los terminadores son secuencias, que terminan la transcripción y se encuentran en los extremos 3' no traducidos de los genes corriente abajo de la secuencia traducida. Los terminadores son determinantes importantes de la estabilidad del ARNm y en algunos casos se ha descubierto que tienen funciones reguladoras espaciales.

60 El término "promotor" se refiere a elementos reguladores en cis no transcritos corriente arriba de la región codificante que regulan la transcripción de genes. Los promotores comprenden elementos iniciadores en cis que especifican el sitio de iniciación de la transcripción y cajas conservadas tales como la caja TATA y motivos que están unidos a factores de transcripción.

65 Las expresiones "alterar la expresión de" y "expresión alterada" de un polinucleótido o polipéptido de la invención, tienen por objeto abarcar la situación en la que el ADN genómico correspondiente a un polinucleótido de la invención se modifica conduciendo de este modo a la expresión alterada de un polinucleótido o polipéptido de la invención. La modificación del ADN genómico puede ser a través de la transformación genética u otros métodos conocidos en la técnica para inducir mutaciones. La "expresión alterada" puede estar relacionada con un aumento o disminución en la cantidad de ARN mensajero y/o polipéptido producido y también puede dar como resultado una actividad alterada

de un polipéptido debido a alteraciones en la secuencia de un polinucleótido y polipéptido producidos.

"Sujeto" como se usa en el presente documento es preferentemente un mamífero e incluye seres humanos y mamíferos no humanos tales como gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, ciervos, ratones, ratas, primates (incluyendo gorilas, macacos y chimpancés), zarigüeyas y otros animales domésticos de granja o de zoológico. En una realización, el mamífero es un ser humano.

El término "presentación" como se usa en el presente documento, se refiere a la presentación de un sujeto en una instalación médica tal como una clínica o un hospital.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o una cantidad capaz de conseguir el resultado deseado, en particular para el tratamiento de la enfermedad o afección deseada, incluyendo la reducción o eliminación de uno o más síntomas o manifestaciones de la enfermedad o afección.

Las expresiones "tratar", "que trata" o "tratamiento" y "prevenir" se refieren a medidas terapéuticas o profilácticas que alivian, mejoran, manejan, evitan, restringen, detienen o invierten la progresión de un episodio biológico caracterizado por un nivel de INS-SP que muestra una desviación de los niveles de control normales, incluyendo un trastorno de manejo de la glucosa, diabetes, hiperglucemia, obesidad, TCA o rechazo de trasplante cardíaco o efectos de los mismos, en particular de SCA. El sujeto puede mostrar una reducción observable o medible (estadísticamente significativa) en uno o más de glucosa, lactato, insulina, ácidos grasos, triglicéridos, Tn, TnI, TnT, BNP, N-BNP, BNP-SP, fragmentos de BNP-SP, ANP, ANP-SP, fragmentos de ANP-SP, creatina cinasa-MB, mioglobina, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, albúmina modificada por isquemia, renina, angiotensina II y otros marcadores clínicos habituales conocidos por los expertos en la materia, que indican una mejora.

La expresión "espectrometría de masas" como se usa en el presente documento se refiere a métodos de filtrado, detección y medición de iones en función de su relación de masa a carga. Véase, por ejemplo, el documento US 5.719.060, el documento US 6.204.500, el documento US 6.107.623, el documento US 6.124.137, el documento US 6.225.047, el documento US 6.268.144, el documento US 7.057.165 y el documento US 7.045.366. Las técnicas de espectrometría de masas comunes incluyen desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI) y desorción e ionización por láser potenciada en superficie (SELDI). Ambas pueden acoplarse con analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF y SELDI-TOF) que permiten el análisis de los analitos en niveles femtomolares en pulsos iónicos muy cortos.

Las versiones de SELDI analizadas por ejemplo en el documento US 5.719.600, el documento US 6.124.137 y el documento US 6.225.047 que son útiles en la presente invención incluyen Captura por Afinidad Potenciada en Superficie (SEAC), Desorción Neta Potenciada en Superficie (ENVIAR) y Fijación y Liberación Fotolábil Potenciada en Superficie (SEPAR).

Se pretende que la referencia a un intervalo de números desvelado en el presente documento (por ejemplo de 1 a 10) también incorpore la 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, de 2 a 8, de 1,5 a 5,5 y de 3,1 a 4,7) y, por tanto, todos los subintervalos de todas los intervalos desvelados expresamente en el presente documento se desvelan expresamente. 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 enumerados han de considerarse indicadas expresamente en la presente solicitud de una manera similar.

Descripción detallada de la invención

La insulina (INS) es una hormona polipeptídica bien conocida secretada por las células β del páncreas. Tiene efectos amplios sobre el metabolismo. Una función principal de la insulina es provocar que las células capten la glucosa de la sangre y la almacenen como glucógeno en el hígado y el músculo y detengan el uso de la grasa como fuente de energía. En la diabetes los niveles de insulina son bajos o incluso ausentes, lo que afecta perjudicialmente al manejo de la glucosa.

Como se muestra en la SEQ ID NO: 1, la preproinsulina es una molécula de 110 aminoácidos. Consiste en dos cadenas polipeptídicas (A y B), unidas por puentes disulfuro. La preproinsulina (1-110) se escinde para proporcionar un péptido señal de 24 aminoácidos (SEQ ID NO: 14), péptido C e insulina. El procesamiento de la preproinsulina humana se muestra en la Figura 5.

Durante mucho tiempo se ha pensado que el papel funcional de la INS-SP se limita a controlar el tráfico de la insulina en el retículo endoplasmático. Una vez conseguido esto, se ha supuesto que el péptido señal después se degrada sin ser secretado desde la célula.²⁵

Echando por tierra visiones habituales, los presentes solicitantes han descubierto ahora que INS-SP, normalmente en forma de fragmentos de INS-SP, aparece en la circulación. Este hallazgo en sí mismo significa que fragmentos de INS-SP e INS-SP son útiles como biomarcador circulante para una gama de acontecimientos biológicos. Por ejemplo, se prevé que, en los diabéticos y diabéticos no diagnosticados, por ejemplo, el nivel de INS-SP estará por encima o por debajo del nivel de control o de referencia normal, dependiendo de si el sujeto es hipo o hiperinsulinémico. Un nivel más bajo es síntoma de una deficiencia en la acción o la secreción de la insulina.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un SCA en un sujeto en el que el acontecimiento se correlaciona con la liberación de un biomarcador INS-SP en la circulación, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de biomarcador INS-SP en una muestra biológica de sangre, plasma o suero del sujeto; y

(b) comparar el nivel de biomarcador INS-SP con el nivel de INS-SP a partir de un valor de control o de referencia,

en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control o de referencia es indicativo de un acontecimiento biológico o trastorno.

La divulgación, por tanto, también proporciona un método para evaluar el manejo de la glucosa en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de biomarcador INS-SP en un sujeto después de la administración de glucosa; y

(b) comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el INS-SP de un control o referencia,

en el que una desviación en el nivel medido de INS-SP con respecto al nivel de control o de referencia es indicativa de un trastorno en el manejo de la glucosa.

Habitualmente, la desviación será un nivel medido más bajo de INS-SP en comparación con un nivel de control. Por ejemplo, en sujetos con hiperglucemia.³¹

En este método, la glucosa puede administrarse como una primera etapa, de acuerdo con el protocolo de ensayo de tolerancia a la glucosa bien conocido (*Oxford Textbook of Medicine*, citado anteriormente).

Pueden hacerse evaluaciones de las concentraciones plasmáticas de biomarcadores INS-SP, por lo general INS-SP plasmático venoso, 2 horas después de que el ensayo de glucosa se administre de acuerdo con protocolos convencionales. Sin embargo, también son útiles mediciones intermedias, por ejemplo, 15, 30, 45, 60, 90 y 105 minutos después de la administración de la glucosa.

La divulgación también proporciona un método para predecir, diagnosticar, evaluar o controlar la diabetes o el potencial diabético en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de biomarcador INS-SP en una muestra biológica del sujeto; y

(b) comparar el nivel de biomarcador INS-SP con el nivel de INS-SP de un control o referencia,

en el que un nivel medido de biomarcador INS-SP superior o inferior al nivel de control es indicativo de diabetes o una predisposición a la diabetes.³¹

Que el nivel de biomarcador INS-SP sea superior o inferior al normal dependerá del estado de la insulina del sujeto.

Los solicitantes también han descubierto sorprendentemente que en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) la concentración circulante de INS-SP es más alta en las primeras horas tras la aparición de los síntomas del paciente - de hecho, en el momento de la presentación en el hospital o clínica. Los niveles observados en las primeras dos a seis horas o cuatro horas fueron sorprendentemente muy altos alcanzando con frecuencia un pico de cinco a quince veces mayor que los niveles en una población de control normal. No ha habido ninguna sugerencia anterior del uso de la insulina o INS-SP o fragmentos de INS-SP como marcador de TCA, rechazo de trasplante cardíaco o para su uso en trastornos TCA o trastornos pulmonares no diagnosticados o que se sospechan.

Estos hallazgos sugieren que los biomarcadores INS-SP son útiles como un marcador de fase temprana muy claro del rechazo de trasplante cardíaco, TCA incluyendo síndromes coronarios agudos (SCA) tales como AMI, en particular IM sin elevación del segmento ST e isquemia cardíaca aguda, y pueden usarse para distinguir TCA de trastornos pulmonares.

Basándose en estos hallazgos sorprendentes, los solicitantes han determinado por primera vez, que sería útil para la detección de INS-SP circulante o variantes o fragmentos del mismo, así como, o, como alternativa, secuencias nucleotídicas que codifican INS-SP o las variantes y fragmentos del mismo en una muestra biológica tomada de un sujeto, en particular aproximadamente seis, cuatro o dos horas desde la aparición o en la presentación clínica con el trastorno.

Son útiles en la invención fragmentos antigénicos o variantes de INS-SP que tengan al menos 4 o 5 aminoácidos de longitud. Se sabe que los péptidos que tienen tan pocos como 4 aminoácidos son biológicamente activos. Véase, por ejemplo, Gilchrist et al., *Biology and Reproduction*, 21, 732-739, 2004; y Sela et al., *Behring Ins. Mitt.*, 91, 54-66, 1992. Fragmentos particularmente útiles están en el extremo N-terminal (1-10) o C-terminal (15-24) de INS-SP. Son ejemplos de péptidos antigénicos específicos INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16 e INS-SP (15-24) SEQ ID NO: 18. Se proporcionan secuencias nucleotídicas correspondientes en las SEQ ID NO: 17 y 19 respectivamente. Estas secuencias son proporcionadas por los solicitantes por primera vez. Tanto las moléculas de ácido nucleico como los péptidos forman aspectos de la invención.

En consecuencia, en otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento de INS-SP en el que dicho ácido nucleico es

(a) SEQ ID NO: 17 o una variante o fragmento de la misma;

(b) SEQ ID NO: 19 o una variante o fragmento de la misma;

(c) una secuencia que tiene al menos el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19;

(d) una secuencia de al menos 10 nucleótidos de longitud capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con (a) o (b); o

(e) un complemento de cualquiera de (a) a (d);

a condición de que la secuencia no sea la SEQ ID NO: 15. La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de ácido nucleico de longitud completa que codifica el péptido señal.

La divulgación también proporciona polipéptidos de INS-SP aislados y polipéptidos de fragmentos de INS-SP codificados por una molécula de ácido nucleico de la invención.

Los polipéptidos específicos de la divulgación incluyen polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 18 como se establecen en el listado de secuencias adjunto. También se contemplan variantes y fragmentos de estos polipéptidos como se han definido en el presente documento o secuencias de aminoácidos que tiene al menos el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % identidad de aminoácidos con el polipéptido de la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18. En un aspecto, las variantes o fragmentos son variantes o fragmentos funcionalmente equivalentes. Es decir, las variantes o fragmentos mantienen la función de la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18 como antígenos o péptidos de señal. El INS-SP (1-24) SEQ ID NO: 14 conocido de longitud completa no se reivindica en sí, pero es útil en la presente divulgación. Por ejemplo, los polipéptidos pueden usarse en la preparación de anticuerpos anti-INS-SP.

Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación o que se describen de otro modo en el presente documento están en una realización aislada. Se pueden aislar a partir de una muestra biológica usando una diversidad de técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia. A modo de ejemplo, dichos polinucleótidos pueden aislarse mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en Mullis et al., Eds. 1994 *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden amplificarse usando cebadores, como se define en el presente documento, derivados de las secuencias polinucleotídicas de la invención. (Véase, por ejemplo, Mullis, Sambrook citado anteriormente; y *Molecular Diagnostic PCR Handbook* Gerrit, V et al., Springer, 2005.).

Los métodos adicionales para aislar polinucleótidos incluyen el uso de todo el polinucleótido de la divulgación, o porciones del mismo, en particular polinucleótidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19 como sondas de hibridación. La técnica de la hibridación de sondas polinucleotídicas marcadas con polinucleótidos inmovilizados sobre soportes sólidos tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nylon, puede usarse para cribar bibliotecas genómicas o de ADNc. De forma similar, pueden acoplarse sondas a perlas e hibridarse con la secuencia diana. El aislamiento puede efectuarse usando protocolos conocidos en la técnica tales como separación magnética. Las condiciones rigurosas de ejemplo de hibridación y lavado son como se han proporcionado anteriormente.

Pueden producirse fragmentos de polinucleótidos mediante técnicas bien conocidas en la técnica tales como la digestión con endonucleasas de restricción y la síntesis de oligonucleótidos.

Puede usarse una secuencia polinucleotídica parcial como una sonda, en métodos bien conocidos en la técnica para identificar la secuencia polinucleotídica de longitud completa correspondiente en una muestra. Dichos métodos incluyen métodos basados en PCR, 5'RACE (*Methods Enzymol* 218: 340-56 (1993); Sambrook et al., citado anteriormente) y método basado en hibridación, métodos informáticos/basados en bases de datos. Pueden usarse marcadores detectables tales como radioisótopos, marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y bioluminiscentes para facilitar la detección. La PCR inversa también permite la obtención de secuencias desconocidas, flanqueando las secuencias polinucleotídicas desveladas en el presente documento, partiendo de cebadores basados en una región conocida (Triglia et al., *Nucleic Acids Res* 16, 8186, (1998)). El método usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento después se circulariza mediante ligadura intramolecular y se usa como un molde de PCR. Se diseñan cebadores divergentes a partir de la región conocida. Con el fin de ensamblar físicamente clones de longitud completa, pueden usarse enfoques convencionales de biología molecular (Sambrook et al., citado anteriormente). Los cebadores y pares de cebadores que permiten la amplificación de polinucleótidos de la invención también forman un aspecto adicional de la presente invención.

Pueden identificarse variantes (incluyendo ortólogos) mediante los métodos descritos. Pueden identificarse polinucleótidos variantes usando métodos basados en PCR (Mullis et al., Eds. 1994 *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser). Normalmente, la secuencia polinucleotídica de un cebador, útil para amplificar variantes de moléculas de polinucleótido por PCR, puede basarse en una secuencia que codifica una región conservada de la secuencia de aminoácidos correspondiente.

Los métodos adicionales para la identificación de polinucleótidos variantes incluyen el uso de todos, o porciones de, los polinucleótidos especificados como sondas de hibridación para cribar bibliotecas genómicas o de ADNc como se ha descrito anteriormente. Normalmente pueden usarse sondas basadas en una secuencia que codifica una región conservada de la secuencia de aminoácidos correspondiente. Las condiciones de hibridación también pueden ser menos rigurosas que las que se usan cuando se criba para detectar secuencias idénticas a la sonda.

Las secuencias variantes, incluyendo variantes tanto de polinucleótidos como de polipéptidos, también pueden identificarse mediante los métodos informáticos descritos anteriormente.

Además, pueden realizarse múltiples alineamientos de secuencias de un grupo de secuencias relacionadas con CLUSTALW (Thompson, et al., *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680 (1994), <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/top.html>) o T-COFFEE (Cedric Notredame et al., *J. Mol Biol.* 302: 205-217 (2000)) o PILEUP, que usa alineamientos por pares progresivos. (Feng et al., *J. Mol. Evol.* 25, 351 (1987)).

Hay disponibles aplicaciones de software de reconocimiento de patrones para la búsqueda de motivos o secuencias distintivas. Por ejemplo, MEME (Multiple Em for Motif Elicitation, (Em múltiple para inducir motivos) encuentra motivos y secuencias distintivas en un conjunto de secuencias, y MAST (Motif Alignment and Search Tool (Herramienta de Alineación y Búsqueda de motivos) usa estos motivos para identificar motivos similares o los mismos en secuencias de consulta. Los resultados de MAST se proporcionan como una serie de alineaciones con datos estadísticos apropiados y una visión de conjunto visual de los motivos encontrados. MEME y MAST se desarrollaron en la Universidad de California, San Diego.

PROSITE (Bairoch et al., *Nucleic Acids Res.* 22, 3583 (1994); Hofmann et al., *Nucleic Acids Res.* 27, 215 (1999)) es un método de identificación de las funciones de las proteínas no caracterizadas traducidas a partir de secuencias genómicas o de ADNc. La base de datos PROSITE (www.expasy.org/prosite) contiene patrones y perfiles biológicamente significativos y está diseñado de manera que pueda usarse con herramientas informáticas apropiadas para asignar una nueva secuencia a una familia conocida de proteínas o para determinar qué dominio o dominios conocidos están presentes en la secuencia (Falquet et al., *Nucleic Acids Res.* 30, 235 (2002)). PROSEARCH es una herramienta que puede buscar en bases de datos SWISS-PROT y EMBL con un patrón o distintivo de secuencia dado.

Las proteínas pueden clasificarse de acuerdo con su relación de secuencia con otras proteínas en el mismo genoma (parálogos) o un genoma diferente (ortólogos). Los genes ortólogos son genes que evolucionaron por especiación a partir de un gen ancestral común y normalmente conservan la misma función a medida que evolucionan. Los genes parálogos son genes que se duplican dentro de un genoma y los genes pueden adquirir nuevas especificidades o funciones modificadas que pueden estar relacionadas con las originales. Se revisan métodos de análisis filogenéticos en Tatusov et al., *Science* 278, 631-637, 1997.

Como se ha señalado anteriormente, la divulgación también se refiere a polipéptidos de INS-SP codificados por las moléculas de ácido nucleico de la invención, e incluye variantes y fragmentos de estos polipéptidos.

Además de los métodos informáticos/de bases de datos descritos anteriormente, pueden identificarse variantes de polipéptidos mediante métodos físicos, por ejemplo mediante cribado de bibliotecas de expresión usando anticuerpos generados contra polipéptidos de la invención (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987) mediante técnicas de ADN recombinante también descritas

por Sambrook et al. o mediante la identificación de polipéptidos a partir de fuentes naturales con la ayuda de dichos anticuerpos.

5 Pueden prepararse polipéptidos, incluyendo polipéptidos variantes, usando métodos de síntesis peptídica bien conocidos en la técnica, tales como la síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (por ejemplo 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 automatizada, por ejemplo, usando un sintetizador de Applied Biosystems (California, EE.UU.). Las formas mutadas de los polipéptidos también pueden
10 producirse usando métodos de síntesis tales como mutagénesis específica de 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.

15 Los polipéptidos y polipéptidos variantes de la presente invención, en un aspecto, se aíslan. Pueden aislarse o purificarse a partir de fuentes naturales usando una diversidad de técnicas que son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, Deutscher, 1990, Ed, *Methods in Enzymology*, Vol. 182, *Guide to Protein Purification* y *Protein Protocols Handbook*, citados anteriormente). Las tecnologías incluyen HPLC, cromatografía de intercambio iónico e inmunocromatografía pero no se limitan a las mismas.

20 Como alternativa, los polipéptidos y polipéptidos variantes pueden expresarse de forma recombinante en células hospedadoras adecuadas y se separan de las células como se analiza a continuación. Los polipéptidos y variantes tienen utilidad en la generación de anticuerpos y la generación de ligandos entre otros usos.

25 Las construcciones genéticas que se describen en el presente documento pueden comprender una o más de las secuencias polinucleotídicas desveladas y/o polinucleótidos que codifican los polipéptidos desvelados, de la invención y pueden ser útiles para la transformación, por ejemplo, de organismos bacterianos, fúngicos, insectos, mamíferos o vegetales. Las construcciones genéticas de la invención tienen por objeto incluir construcciones de expresión como se definen en el presente documento. Se incluyen vectores (tales como pBR322, pUC18, pU19, mp18, mp19, ColE1, PCR1 y pKRC), fagos (tales como lambda gt10) y plásmidos M13 (tales como pBR322, pACYC184, pT127, RP4, pJ101, SV40 y BPV), cósmidos, YAC, BAC vectores lanzadera tales como pSA3, transposones pAT28 (tales como los que se describen en el documento US 5.792.294) y similares.

35 Las construcciones pueden incluir convenientemente un gen de selección o marcador seleccionable. Normalmente se usa un marcador de resistencia a antibióticos tales como ampicilina, metotrexato o tetraciclina.

40 Los promotores útiles en las construcciones incluyen los sistemas β -lactamasa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotor tac que son todos bien conocidos en la técnica. Los promotores de levadura incluyen 3-fosfoglicerato cinasa, enolasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, glucocinasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa pero no se limitan a las mismas.

También pueden emplearse potenciadores para actuar sobre los promotores para potenciar la transcripción. Los potenciadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen potenciador de SV40, potenciador del promotor temprano d citomegalovirus, globina, albúmina, insulina y similares.

45 Los métodos para producir y usar construcciones genéticas y vectores son bien conocidos en la técnica y se describen en general en Sambrook et al., (citado anteriormente) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1987. Los métodos para transformar células hospedadoras seleccionadas con los vectores también se conocen, por ejemplo, el tratamiento de cloruro de calcio descrito por Cohen, SN; *PNAS* 69, 2110, 1972.

50 Para un análisis general de las construcciones, promotores, potenciadores y células hospedadoras, véase *Principles of Gene Manipulation and Genomics*; Primrose, S et al., Blackwell Publishing 2006, Ed. 7. y *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*, Dale, J et al., Wiley-Interscience, 2007, Ed. 2.

55 Las células hospedadoras que comprenden las construcciones genéticas y vectores descritos pueden derivar de fuentes procariontas o eucariotas, por ejemplo, levaduras, bacterias, hongos, insectos (por ejemplo, baculovirus), animales, mamíferos u organismos vegetales. En una realización, las células hospedadoras son células hospedadoras aisladas. Los procariontas más habitualmente empleados como células hospedadoras son cepas de *E. coli*. Otros hospedadores procariontas incluyen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Listeria*,
60 *Saccharomyces*, *Salmonella* y *Mycobacteria* pero no se limitan a los mismos.

Las células eucariotas para la expresión de proteína recombinante incluyen, pero no se limitan a, células Vero, HeLa, CHO (células de ovario de hámster chino), 293, células BHK, células MDCK y células COS, así como estirpes celulares de cáncer de próstata tales como PrEC, LNCaP, Du 145 y RWPE-2. Las células están disponibles de
65 ATCC, Virginia, EE.UU.

Los promotores procarióticos compatibles con la expresión de moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen promotores constitutivos conocidos en la técnica (tales como el promotor int del bacteriófago lambda y el promotor bla de la secuencia génica de beta-lactamasa de pBR322) y promotores regulables (tales como lacZ, recA y gal). Un sitio de unión a ribosomas corriente arriba de la secuencia codificante también puede ser necesaria para la expresión.

Son útiles células hospedadoras que comprenden construcciones genéticas, tales como construcciones de expresión, en métodos para la producción recombinante de polipéptidos. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al. citado anteriormente). Los métodos habitualmente implican el cultivo de células hospedadoras en un medio apropiado en condiciones adecuadas para, o que conducen a, la expresión y selección de un polipéptido de la invención. Las células con un marcador seleccionable pueden, además, cultivarse en un medio apropiado para la selección de células hospedadoras que expresan un polipéptido de la invención. Las células hospedadoras transformadas que expresan un polipéptido de la invención se seleccionan y se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido. El polipéptido recombinante expresado, puede separarse y purificarse del medio de cultivo usando métodos bien conocidos en la técnica incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis y similares (por ejemplo, Deutscher, Ed, 1990, *Methods in Enzymology*, Vol 182, *Guide to Protein Purification*). Las células hospedadoras también pueden ser útiles en métodos para la producción de un producto generado por un polipéptido expresado de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA) en un sujeto, comprendiendo el método:

medir el nivel de un biomarcador INS-SP en una muestra de sangre, plasma o suero tomada o derivada del sujeto y comparar el nivel de dicho INS-SP con el nivel de biomarcador INS-SP de un control o referencia o intervalo de referencia en el que un nivel medido de biomarcador INS-SP superior al nivel de control o de referencia es indicativo de SCA.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para controlar una respuesta al tratamiento de un trastorno cardíaco agudo (TCA) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de biomarcador INS-SP en una muestra biológica del sujeto y comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el nivel de INS-SP de un control, referencia o intervalo de referencia, en el que un cambio en el nivel medido de biomarcador INS-SP con respecto al nivel de control o de referencia es indicativo de una respuesta al tratamiento.

Se sabe en la técnica que pueden usarse precursores de BNP, tales como proBNP27-102 proBNP27-47 en la predicción o diagnóstico de un episodio de rechazo de trasplante cardíaco y para distinguir entre causas pulmonares y cardiovasculares de disnea (falta de aliento). Véase el documento US 2005/0244902. Se contempla que INS-SP pueda usarse como un marcador precoz de rechazo de trasplante cardíaco basado en el análisis de tejido cardíaco y para distinguir trastornos pulmonares de trastornos cardíacos agudos.

En consecuencia, la divulgación también proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un episodio de rechazo de trasplante cardíaco en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador INS-SP en una muestra biológica de un sujeto después del trasplante de corazón y comparar el nivel de dicho biomarcador INS-SP con el nivel de INS-SP de un control, referencia o intervalo de referencia, en el que un nivel medido de un biomarcador INS-SP superior a un nivel de control o de referencia es indicativo de rechazo del trasplante.

En una realización, la invención proporciona un método para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de un biomarcador INS-SP en una muestra biológica del sujeto en las primeras aproximadamente dos horas desde el inicio de, o la presentación clínica con, SCA.

A nivel medido de un biomarcador INS-SP se compara con el nivel de biomarcador INS-SP de un control, referencia o intervalo de referencia en el que un nivel medido del biomarcador INS-SP superior al nivel de control o de referencia es indicativo de TCA o rechazo del trasplante.

El lector experto apreciará que, con fines de evaluación, el nivel de biomarcador INS-SP generalmente se correlaciona con un valor de referencia o intervalo o un valor de control.

Como se usa en el presente documento un control puede ser un individuo o grupo del que se toman muestras de biomarcador INS-SP y se determina un nivel de biomarcador INS-SP medio. Por lo general, el individuo o grupo comprenderá individuos sanos normales o un grupo de individuos que no se sabe que padecen un acontecimiento biológico que se ha de controlar, tal como trastornos del manejo de la glucosa, diabetes, TCA (incluyendo el rechazo de trasplante cardíaco) o TCA/trastorno pulmonar. Los niveles de biomarcadores INS-SP en la mayoría de los individuos son de entre 0,5-40 pmol/l y el nivel de control medio es de aproximadamente 9 pmol/l. Como alternativa, el nivel de control puede evaluarse basándose en una pluralidad de lecturas de individuos o grupos previamente sometidos a ensayo.

Otro ejemplo de un nivel de control es una medida radiométrica entre un biomarcador INS-SP y los niveles de insulina en el tejido cardíaco o el tejido de un diabético o individuo con un trastorno del manejo de la glucosa. El nivel o niveles de biomarcador INS-SP del sujeto puede compararse con el nivel de biomarcador INS-SP medio para esa población de control. El nivel de INS-SP en la población de control de tejido cardíaco puede estar en el orden de
 5 aproximadamente 1,5 a 3, habitualmente de aproximadamente 2 a 3 o de aproximadamente 2,5 a 3 veces (o más) más alto que los niveles de INS-SP en la población de control normal. El nivel de INS-SP en la población de control diabética o con trastorno del manejo de la glucosa puede estar en el orden de aproximadamente dos a tres veces inferior o superior (dependiendo de la naturaleza de la diabetes) que los niveles de INS-SP en la población de control normal.³¹ Como alternativa, el control puede ser una o más lecturas o la media de dichas lecturas tomadas del
 10 mismo sujeto en un momento anterior. La determinación de controles y niveles de control apropiados para métodos particulares es bien sabido en la técnica.

Se apreciará que la etapa de medir niveles de biomarcadores INS-SP en una muestra puede ser una sola medición en una sola muestra o mediciones repetidas en un número de muestras dependiendo del acontecimiento biológico que se está estudiando. En el caso de SCA, la medición puede comprender, por ejemplo, de 1 a 20 mediciones de un biomarcador INS-SP, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 1 o 2 o 2 o 3 mediciones, en muestras tomadas o derivadas de un sujeto en momentos diferentes. En una realización, se toman mediciones aproximadamente en las primeras seis, cinco, cuatro, tres, dos horas o en la primera hora desde la aparición o la presentación clínica con un trastorno. También pueden tomarse mediciones individuales o repetidas fuera del período de muestra anterior para establecer
 15 si el nivel de biomarcador INS-SP ha ascendido o descendido en comparación con el nivel de control normal o el nivel de control de tejido cardíaco o niveles o intervalos de referencia relacionados.

En una realización, el método comprende la medición de niveles de biomarcadores INS-SP en muestras tomadas de aproximadamente dos a aproximadamente cuatro horas o de aproximadamente dos a aproximadamente tres horas desde la aparición o la presentación o la medición inicial del nivel de INS-SP.
 25

Como se ha señalado anteriormente, los niveles de INS-SP medidos en las primeras seis, cuatro o dos horas desde la aparición o la presentación pueden ser de cinco a quince veces superiores a los niveles de biomarcadores INS-SP medidos en un control normal.
 30

En otra realización, un nivel de un biomarcador INS-SP en la muestra en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 350 pmol/l o de aproximadamente 45 a aproximadamente 300 pmol/l, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 pmol/l o de aproximadamente 55 a aproximadamente 200 pmol/l es indicativo de SCA.

En el caso de un acontecimiento biológico, tal como la diabetes, por ejemplo, o trastornos del manejo de la glucosa, la medición puede comprender múltiples cálculos junto con la evaluación clínica establecida, tal como la utilizada normalmente para la insulina.
 35

La muestra biológica como se ha definido anteriormente puede ser cualquier material biológico en el que pueda ubicarse o secretarse un biomarcador INS-SP. En una realización una muestra biológica es sangre, suero o plasma.
 40

Ensayos de ácidos nucleicos

La presencia de INS-SP y su nivel de expresión en la muestra puede determinarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica tales como Transferencia Southern, Transferencia Northern, FISH o PCR cuantitativa para cuantificar la transcripción de ARNm [(Thomas, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 5201-5205 1980), (Jain KK, *Med Device Technol.* Mayo de 2004; 15(4): 14-7)], transferencia puntual, (análisis de ADN) o hibridación *in situ* usando una sonda marcada de forma apropiada, basada en las secuencias proporcionadas en el presente documento.
 45

En consecuencia, la divulgación también proporciona un ensayo para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la divulgación, en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra con una sonda polinucleotídica que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas; y
 55

(b) detectar la presencia de un complejo de hibridación en la muestra.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19 o una variante o fragmento de las mismas.
 60

En un aspecto, la sonda de hibridación es una sonda marcada. Los ejemplos de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioenzima y biotina-avidina. El marcado y visualización de sondas marcadas se realiza de acuerdo con métodos conocidos en la técnica tales como los anteriores.

Por comodidad, la sonda de ácido nucleico puede inmovilizarse sobre un soporte sólido incluyendo resinas (tales como poliacrilamidas), hidratos de carbono (tales como sefarosa), plástico (tal como policarbonato) y perlas de látex
 65

pero no limitados a los mismos.

Como se ha analizado anteriormente la sonda de molécula de ácido nucleico puede ser preferentemente un ARN, ADNc o molécula de ADN. En una realización, la sonda es o incluye las SEQ ID NO: 17 y 19.

5 Las condiciones de hibridación rigurosas son como se ha analizado anteriormente.

10 El nivel de expresión del marcador de ácido nucleico puede determinarse usando técnicas conocidas en la técnica, tales como RT-PCR y técnicas de electroforesis incluyendo SDS-PAGE. Usando estas técnicas se amplifica la secuencia de ADN o ADNc de una molécula de ácido nucleico de la invención, en una muestra sujeta, y se mide el nivel de ADN o ADNc o ARN.

En un método alternativo el nivel de ADN, ADNc o ARN puede medirse directamente en la muestra sin amplificación.

15 En un aspecto del método es el análisis por hibridación por transferencia Northern. Las sondas para su uso en el análisis por hibridación por transferencia Northern pueden prepararse basándose en las secuencias de biomarcadores INS-SP identificadas en el presente documento. En un aspecto, una sonda incluye al menos 10, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 36, 42, 51, 60, 63, 66, 69, 70 o 72 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de referencia.

20 Como alternativa, el nivel de expresión puede medirse usando ensayos de PCR basados en la transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos para las secuencias de ácidos nucleicos. Si se desea, puede hacerse una comparación del nivel del polinucleótido de biomarcador INS-SP en la muestra con referencia a una molécula de ácido nucleico de control cuya expresión es independiente del parámetro o afección que se mide. Una molécula de ácido nucleico de control se refiere a una molécula en la que el nivel no difiere entre el estado de trastorno o rechazo de trasplante y el estado saludable. Los niveles de la molécula de control pueden usarse para normalizar niveles en las poblaciones comparadas. Un ejemplo de una molécula de control de este tipo es GAP-DH. El polinucleótido de biomarcador INS-SP de la invención cambiará los niveles con el acontecimiento biológico o trastorno.

30 **Ensayos de péptidos**

En una realización la etapa de medición comprende la detección de la unión entre un biomarcador INS-SP y un agente de unión que se une (incluyendo que se une selectivamente o específicamente) a INS-SP o un fragmento o variante del mismo. Como pre-etapa en la medición, un polipéptido de biomarcador INS-SP puede unirse con un agente de unión que se une a INS-SP o un fragmento o variante del mismo.

En consecuencia, en una realización la invención proporciona un ensayo para un biomarcador INS-SP en una muestra de sangre, plasma o suero, comprendiendo el ensayo detectar y medir el nivel de un biomarcador INS-SP en la muestra.

En un aspecto, la muestra biológica se obtiene de un sujeto a las seis o cuatro horas desde el inicio del TCA, el rechazo de trasplante cardíaco o el TCA/trastorno pulmonar o a las cuatro horas desde la presentación clínica con TCA, rechazo de trasplante cardíaco o TCA/trastorno pulmonar.

45 En una realización, la invención proporciona un ensayo para un biomarcador INS-SP que comprende:

(a) unir uno o más polipéptidos de biomarcadores INS-SP de una muestra de sangre, plasma o suero; y

(b) medir el nivel de polipéptido de biomarcador INS-SP unido.

50 En una realización, el polipéptido de biomarcador INS-SP se selecciona entre el grupo INS-SP 1-9.

En una realización, el polipéptido de biomarcador INS-SP se une usando un agente de unión. El agente de unión es un agente de unión selectivo (específico). Es decir, que tiene una baja reactividad cruzada con otros marcadores de acontecimientos biológicos y más en particular insulina. El agente de unión es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo puede producirse contra cualquier parte antigénica del biomarcador INS-SP, incluyendo en el extremo N-terminal (1-9). En una realización, el anticuerpo se genera contra INS-SP (SEQ ID NO: 16).

60 La presente invención también se refiere a dichos agentes de unión, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos y a sus usos. Los usos incluyen una herramienta de ensayo o pronóstico, diagnóstico o control para el biomarcador INS-SP. El ensayo o la herramienta pueden usarse para controlar el SCA.

65 Los anticuerpos pueden estar en forma aislada o purificada. Un anticuerpo que se une a INS-SP o un fragmento o variante del mismo puede estar en cualquier forma, incluyendo todas las clases de anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, monocatenarios, humanos, humanizados y anticuerpos quiméricos producidos

mediante recombinación genética. También se incluye antisuero obtenido mediante la inmunización de un animal tal como un ratón, rata o conejo con INS-SP o un fragmento o variante del mismo. Los anticuerpos pueden unirse a una secuencia INS-SP común en un grupo de fragmentos de INS-SP, o a un fragmento de INS-SP específico o incluso a conjuntos de fragmentos de INS-SP.

5 Un fragmento de un anticuerpo o un anticuerpo modificado también puede usarse en el presente documento a condición de que se una a BNP-SP o un fragmento o variante del mismo. El fragmento de unión a antígeno puede ser Fab, F(ab'), F(ab''), un fragmento Fc o Fv o Fv monocatenario (scFv), en el que fragmentos Fv de cadenas H y L se enlazan mediante un enlazador apropiado (Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83 (1988)). La porción "Fc" de un anticuerpo se refiere a aquella porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de la región constante de la cadena pesada; CH1, CH2 y CH3, pero no incluye la región variable de la cadena pesada.

10 La porción "Fv" de un anticuerpo es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. La región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en estrecha asociación, no covalente.

15 Los fragmentos Fab contienen el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de las cadenas pesadas. Los fragmentos Fab' tienen unos pocos restos añadidos al extremo carboxi Fab del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab')₂ representan pares de fragmentos Fab' con bisagras de cisteína entre ellos, que han sido separados. El fragmento F(ab')₂ tiene sitios de unión de dos antígenos. Los fragmentos Fab pueden producirse mediante digestión con papaína de los anticuerpos.

20 Para un análisis 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 editores; *PNAS USA* 90: 6444-6448 (1993); *Nature* 321:522-525 (1986); *Nature* 332:323-329 (1988) y el documento WO 2005/003154.

25 Los métodos para preparar anticuerpos y detectar, modificar y aislar los mismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Maintaining and using Antibodies: A Practical Handbook*, Howard, G et al., CRC Press 2006; *Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, Golemis E (Ed), CSHL Press, 2002; Harlow y Lane (1998,¹¹ Milstein¹⁸, Suresh¹⁹ y Brennan²⁰). En una realización los anticuerpos utilizados se producen mediante la inmunización de un mamífero hospedador adecuado. También pueden usarse como inmunógenos proteínas de fusión que comprenden biomarcadores INS-SP.

30 Un anticuerpo puede modificarse mediante conjugación con una diversidad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), biotina, estreptavidina y marcadores quimioluminiscentes, fluorescentes, colorimétricos y radioinmunométricos como se analiza en el presente documento. El anticuerpo modificado puede obtenerse modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

35 Como alternativa, un anticuerpo puede obtenerse como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de anticuerpo no humano y la región constante derivada de anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) derivada de anticuerpo no humano, la región marco conservada (FR, por sus siglas en inglés) derivada de anticuerpo humano y la región constante. Dichos anticuerpos pueden prepararse usando métodos conocidos de la técnica.^{16,17,22}

40 En resumen, los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia. Pueden generarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, se inyecta el agente inmunizante y/o adyuvante en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir INS-SP o un fragmento o variante del mismo o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína conocida por ser inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, tiroglobulina bovina e inhibidor de 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 experimentación excesiva.

45 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975¹¹, el documento US 4.196.265, el documento US 4.816.567 y Golemis (citado anteriormente). Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado, de forma alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero. Son estirpes celulares inmortalizadas preferidas estirpes de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, de la American Type Culture Collection, Virginia, EE.UU. Pueden usarse inmunoensayos para la detección de estirpes celulares inmortalizadas que secretan el anticuerpo de interés. Pueden usarse secuencias de INS-SP o fragmentos o variantes del mismo en el cribado.

En consecuencia, también se contemplan en el presente documento hibridomas que son estirpes celulares inmortalizadas capaces de secretar un anticuerpo monoclonal específico para INS-SP.

5 Los medios bien conocidos para el establecimiento de la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma incluyen inmunoprecipitación, inmunoensayo ligado a radiación (RIA), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y transferencia Western. (Lutz et al., *Exp Cell Res* 175: 109-124 (1988), Golemis (citado anteriormente) y Howard (citado anteriormente)). Por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., *Anal Biochem.* 107:220 (1980). Las muestras de animales inmunizados pueden cribarse de forma similar para
10 determinar la presencia de anticuerpos policlonales.

También pueden obtenerse anticuerpos monoclonales a partir de células hospedadoras recombinantes. Puede obtenerse ADN que codifica el anticuerpo a partir de una estirpe celular de hibridoma. El ADN se coloca a continuación en un vector de expresión, se transfecta en células hospedadoras (por ejemplo, células COS, células CHO, células de *E. coli*) y el anticuerpo se produce en las células hospedadoras. Después, el anticuerpo puede aislarse y/o purificarse usando técnicas convencionales.
15

Otros métodos de la técnica conocidos para la producción de anticuerpos monoclonales tales como a partir de bibliotecas de fagos, también pueden usarse. Véase, por ejemplo, *Nature* 352:624-628 (1991).
20

Para facilitar la detección, los anticuerpos y fragmentos del presente documento pueden marcarse con marcadores detectables tales como compuestos fluorescentes, bioluminiscentes y quimioluminiscentes, así como radioisótopos, perlas magnéticas y marcadores de afinidad (por ejemplo, biotina y avidina). Los ejemplos de marcadores que permiten la medición indirecta de la unión incluyen enzimas en las que el sustrato puede proporcionar un producto fluorescente coloreado, las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa y similares. Pueden usarse fluorocromos (por ejemplo, rojo de Texas, fluoresceína, ficobiliproteínas y ficoeritrina) con un clasificador de células activado por fluorescencia. Las técnicas de marcaje son bien conocidos en la técnica.
25

30 Los anticuerpos monoclonales secretados por las células pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, HPLC de fase inversa, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982).
35

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos también pueden producirse por medio de ADN recombinante (véase por ejemplo la Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567). También son posibles modificaciones del ADN, tales como la sustitución con la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567 anterior). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica (Patentes de los EE.UU. N.º 5.334.708, 5.821.047 y 7.476.724). La producción de anticuerpos quiméricos (documento US 4.816.567), bivalentes (documento US 5.843.708) y anticuerpos multivalentes (documento US 6.020.153) también se contempla en el presente documento.
40

45 Los anticuerpos monoclonales quiméricos son anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una (sub)clase particular de anticuerpos correspondiente. El resto de la cadena es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra (sub)clase de anticuerpos, y fragmentos de los mismos, a condición de que presenten la actividad biológica requerida. (Véase el documento US 4.816.567 mencionado anteriormente).
50

Los anticuerpos de la invención pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas en las que restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana. La producción de anticuerpos humanizados a partir de fuentes no humanas tales como conejo, rata y ratón son bien conocidos.^{13,14,15}
55

También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos¹⁶; y métodos transgénicos, véase, por ejemplo, Neuberger 1996¹⁷; y Vaughan et al., 1998¹⁸.
60

También pueden ser útiles anticuerpos biespecíficos. Estos anticuerpos son monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, INS-SP o una variante o fragmento del mismo y un antígeno seleccionado entre el grupo que incluye preproinsulina, ANP, ANP-SP, BNP, CK-MB, TnT, Tnl, BNP, BNP-SP, NT-BNP, mioglobina, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina, albúmina modificada por isquemia y angiotensina II.
65

También se contemplan en el presente documento anticuerpos con más de dos especificidades, por ejemplo, anticuerpos triespecíficos.

5 Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Milstein y Cuello 1983¹⁹, Suresh et al., 1986²⁰ y Brennan et al., 1985²¹.

El biomarcador INS-SP que se une o se une selectivamente por el anticuerpo es INS-SP o una variante o fragmento del mismo como se ha analizado anteriormente.

10 En una realización, el anticuerpo se une al extremo N-terminal (1-9) de INS-SP. Los ejemplos de péptidos antigénicos específicos a los que se une selectivamente el agente de unión incluyen INS-SP (1-9) SEQ ID NO: 16.

15 La unión de un biomarcador INS-SP puede detectarse mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo específico (a base de anticuerpos) y no específico (tal como HPLC en fase sólida). Más habitualmente, los anticuerpos en el presente documento se detectan usando un ensayo tal como ELISA o RIA como se ha señalado anteriormente. También son factibles ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich, ensayos no competitivos, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico o ensayos inmunoradiométricos, ensayos de luminiscencia, ensayos de quimioluminiscencia y análisis de espectrometría de masas tales como desorción e ionización por láser potenciada en superficie (SELDI), ionización por electronebulización (IEN), desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI), espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR) solos o en combinación con agentes de unión no específicos, tales como formatos de cromatografía. Véase, por ejemplo, Golemis, E y G. Howard (citados anteriormente).

25 Convenientemente, un anticuerpo puede fijarse a un sustrato sólido para facilitar el lavado y el aislamiento del complejo INS-SP/anticuerpo. La unión de anticuerpos a un soporte sólido puede coseguirse usando técnicas conocidas. 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, el INS-SP puede adsorberse sobre un sustrato sólido tal como sílice adsorbente o partículas de resina o chips de silicio opcionalmente recubiertos o derivatizados con intercambio de iones, fase inversa (por ejemplo, revestimiento C18) u otros materiales. El sustrato puede estar en forma de perlas, placas, tubos, varillas 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 el documento US 6.225.047 y el documento US 6.329.209. Los biochips pueden incluir una superficie cromatográfica. Biochips o placas con ubicaciones direccionables y placas de microtitulación individuales son en particular útiles. También se prefieren para su uso sistemas múltiples 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 que se han de medir pueden incluir otros marcadores cardíacos, así como INS-SP o variantes o fragmentos del mismo. Un ejemplo de un sistema de perlas múltiple adecuado para su uso en el presente documento es el sistema Luminex Fluokine Multianalyte Profiling system.

40 Los métodos de ensayo de anticuerpos son bien conocidos en la técnica véase, por ejemplo, el documento US 5.221.685, el documento US 5.310.687, el documento US 5.480.792, el documento US 5.525.524, el documento US 5.679.526, el documento US 5.824.799, el documento US 5.851.776, el documento US 5.885.527, el documento US 5.922.615, el documento US 5.939.272, el documento US 5.647.124, el documento US 5.985.579, el documento US 6.019.944, el documento US 6.113.855, el documento US 6.143.576 y para ensayos sin marcar el documento US 5.955.377 y el documento US 5.631.171. Véase también Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* páginas 147-158 (CRC Press, Inc 1987), Harlow y Lane (1998) *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, y el documento US 2005/0064511 y para una descripción de formatos y condiciones de ensayo. Todas las referencias anteriores se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

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, que están bien descritos.²²

55 La unión de un biomarcador INS-SP y un anticuerpo para formar un complejo puede detectarse directa o indirectamente. La detección directa se realiza usando marcadores tales como fluorescencia, luminiscencia, radionucleidos, metales, colorantes y similares. La detección indirecta incluye la unión a marcadores detectables tales como digoxina o enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina para formar un anticuerpo marcado seguida de una etapa de detección del marcador mediante la adición de reactivos de detección.

60 La peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, puede incubarse con sustratos tales como diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) y peróxido para generar un producto coloreado cuya absorbancia puede medirse, o con luminol y el peróxido para proporcionar luz quimioluminiscente que puede medirse en un luminómetro tal como se conoce en la técnica. Puede hacerse reaccionar biotina o digoxina con agentes de unión que se unen fuertemente a ellas. Por ejemplo, las proteínas avidina y estreptavidina se unen fuertemente a la biotina. Un marcador medible adicional después se une o se enlaza de forma covalente a las mismas, ya sea por reacción directa con la proteína o mediante el uso de agentes de reticulación habitualmente disponibles, tales como MCS y carbodiimida, o mediante la adición de agentes quelantes.

65

Generalmente, el complejo se separa de los reactivos no acomplexados, por ejemplo, mediante centrifugación. Si el anticuerpo está marcado, la cantidad de complejo se reflejará por la cantidad de marcador detectado. Como alternativa, un biomarcador INS-SP puede marcarse mediante la unión a un anticuerpo y detectarse en un ensayo competitivo mediante la medición de una reducción en biomarcador INS-SP marcado unido cuando el biomarcador
 5 INS-SP marcado con anticuerpo se incuba con una muestra biológica que contiene biomarcador INS-SP no marcado. Pueden usarse otros inmunoensayos, por ejemplo, un ensayo sándwich.

En un aspecto, después del contacto con el anticuerpo, por lo general durante la noche durante de 18 a 25 horas a
 4 °C o durante de 1 a 2 a 4 horas a 25 °C a 40 °C, el biomarcador INS-SP marcado unido al agente de unión
 10 (anticuerpo) se separa del biomarcador INS-SP marcado no unido. En ensayos en fase de solución, la separación puede conseguirse mediante la adición de un anticuerpo anti gamma globulina (segundo anticuerpo) acoplado a partículas de fase sólida tales como celulosa o material magnético. El segundo anticuerpo se genera en una especie diferente a la utilizada para el anticuerpo primario y se une al anticuerpo primario. Por tanto, todos los anticuerpos primarios se unen a la fase sólida a través del segundo anticuerpo. Este complejo se retira de la solución mediante
 15 centrifugación o atracción magnética y el péptido marcado unido se mide usando el marcador unido a él. Otras opciones para la separación del marcador unido del libre incluyen la formación de complejos inmunitarios, que precipitan en la solución, la precipitación de los anticuerpos mediante polietilenglicol o la unión de péptido marcado libre a carbón y la eliminación de la solución mediante centrifugación o filtración. El marcador en la fase unida o libre separada se mide mediante un método apropiado tal como los presentados anteriormente.

También pueden configurarse ensayos de unión competitiva como ensayos de fase sólida que son más fáciles de realizar y, por tanto, son preferibles a los anteriores. Este tipo de ensayo usa placas con pocillos (habitualmente conocidos como placas de ELISA o de inmunoensayo), perlas sólidas o las superficies de tubos. El anticuerpo primario ya sea se adsorbe o se une covalentemente a la superficie de la placa, perla o tubo o se une indirectamente
 25 a través de un segundo anticuerpo anti gamma globulina o anti región Fc adsorbido o unido covalentemente a la placa. La muestra y el péptido marcado (como anteriormente) se añaden a la placa ya sea juntos o secuencialmente y se incuban en condiciones que permiten la competencia por la unión al anticuerpo entre el INS-SP en la muestra y el péptido marcado. El péptido marcado no unido puede aspirarse posteriormente y la placa puede aclararse dejando el péptido marcado unido al anticuerpo fijado a la placa. Después, el péptido marcado puede medirse usando técnicas
 30 descritas anteriormente.

Los ensayos sándwich tienen una mayor especificidad, velocidad y un mayor intervalo de medición. En este tipo de ensayo un exceso del anticuerpo primario frente a un biomarcador INS-SP se fija al pocillo de una placa, perla o tubo de ELISA a través de adsorción, acoplamiento covalente o un anticuerpo anti Fc o globulina gamma, como se ha
 35 descrito anteriormente para ensayos de unión de competición 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 por lo general es rápida. También se incuba un segundo anticuerpo frente a un biomarcador INS-SP con la muestra o bien simultáneamente o secuencialmente con el anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo se escoge para que se una a un sitio en el biomarcador INS-SP que sea diferente del sitio de unión del anticuerpo primario. Estas dos reacciones de anticuerpos dan como resultado un sándwich con el biomarcador INS-SP de la muestra
 40 intercalado entre los dos anticuerpos. El segundo anticuerpo por lo general está marcado con un compuesto fácilmente medible como se ha detallado anteriormente para los ensayos de unión competitiva. Como alternativa, puede ponerse en contacto con la muestra un tercer anticuerpo marcado que se une específicamente al segundo anticuerpo. Tras eliminar por lavado el material no unido el anticuerpo marcado unido puede medirse y cuantificarse mediante métodos esbozados para los ensayos de unión competitiva.
 45

También puede usarse un ensayo de tipo tira reactiva. Estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Pueden, por ejemplo, emplear partículas pequeñas tales como oro o partículas de látex coloreadas con anticuerpos específicos fijados. La muestra de líquido que se ha de medir puede añadirse a un extremo de una membrana o tira de papel precargado con las partículas y se deja migrar a lo largo de la tira. La unión del antígeno en la muestra a las
 50 partículas modifica la capacidad de las partículas para unirse a los sitios de captura, que contienen agentes de unión para las partículas tales como antígenos o anticuerpos, adicionalmente a lo largo de la tira. La acumulación de las partículas coloreadas en estos sitios da como resultado el desarrollo de color que depende de la concentración de antígeno competitivo en la muestra. Otros métodos de tira reactiva pueden emplear anticuerpos unidos covalentemente a tiras de papel o membrana para atrapar antígeno en la muestra. Reacciones posteriores que emplean segundos anticuerpos acoplados a enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante y la incubación con sustratos para producir un resultado de color, fluorescencia o luz quimioluminiscente, permitirá la cuantificación de antígeno en la muestra.
 55

Como se analiza en los siguientes ejemplos, en una realización el radioinmunoensayo (RIA) es la técnica de laboratorio utilizada. En una RIA se emplean un antígeno radiomarcado y antígeno no marcado en la unión competitiva con un anticuerpo. Los radiomarcadores comunes incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C .
 60

Los radioinmunoensayos que implican la precipitación de un biomarcador INS-SP con un anticuerpo específico y proteína de unión a anticuerpo radiomarcado puede medir la cantidad de anticuerpo marcado en el precipitado que es proporcional a la cantidad del biomarcador INS-SP en la muestra. Como alternativa, se produce un biomarcador
 65

INS-SP marcado y se usa una proteína de unión a anticuerpo no marcada. Después se añade una muestra biológica que se ha de ensayar. La disminución en el recuento del biomarcador INS-SP marcado es proporcional a la cantidad de biomarcador INS-SP en la muestra.

- 5 En el RIA también es factible separar biomarcadores INS-SP unidos de biomarcadores INS-SP libres. Esto puede implicar la precipitación del complejo biomarcador INS-SP/anticuerpo con un segundo anticuerpo. Por ejemplo, si el complejo biomarcador INS-SP/anticuerpo contiene anticuerpo de conejo entonces puede usarse anticuerpo anti-conejo de burro para precipitar el complejo y puede contarse la cantidad de marcador. Por ejemplo, en un contador LKB, Gammamaster. Véase Hunt et al.²²

10 Los métodos de la invención comprenden adicionalmente la medición de los niveles de uno o más de otros marcadores de SCA que no son un biomarcador INS-SP. El nivel del otro marcador o marcadores puede compararse con los niveles de control medios a partir de una población de control. Una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control medio es predictiva o diagnóstica de SCA.

15 Aunque los métodos de la invención se han descrito con respecto a un nivel superior o a un aumento en los niveles de biomarcador INS-SP que es indicativo de TCA o rechazo de trasplante cardíaco, y un nivel inferior, diferente o desviado de biomarcador INS-SP que es indicativo de diabetes o trastornos del manejo de la glucosa, también es posible que en algunos acontecimientos o trastornos los niveles de biomarcador o biomarcadores INS-SP
20 desciendan o sean inferiores o aumenten o sean superiores, dependiendo del efecto metabólico del acontecimiento o trastorno. También se contemplan desviaciones de la medición por encima o por debajo de un nivel de control.

Otros marcadores que son particularmente útiles en el presente documento para TCA y el rechazo de trasplante cardíaco incluyen troponina, troponina T, troponina I, creatina cinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP, BNP-SP, fragmentos de BNP-SP, ANP, ANP-SP, fragmentos de ANP-SP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina, albúmina modificada por isquemia y angiotensina II¹. Estos marcadores están todos implicados en la disfunción o enfermedad cardíaca. Para la diabetes y trastornos del manejo de la glucosa, otros marcadores incluyen insulina, lactato, glucosa, ácidos grasos y triglicéridos o marcadores para los mismos. Los ensayos para dichos marcadores son bien conocidos y se usan en la técnica. Por ejemplo, muchos de dichos
25 ensayos se usan habitualmente en el ámbito clínico como se ha descrito por Vogel, H, (2007) *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* Ed 3. Springer pp. Ed.: 3, página 2071 y por Runge et al. (2006) *Principles of Molecular medicine* Ed. 2 Springer, página 1268. Hay disponibles en el mercado kits y reactivos para realizar dichos ensayos de un número de proveedores incluyendo los ensayos de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos QuantiChrom™ y EnzyChrome™ (BioAssay Systems, California, EE.UU.) y kits de ensayo de glucosa, triglicéridos y
30 ácidos grasos libres (Biovision, California, EE.UU.). La correlación del nivel de INS-SP con otros marcadores puede aumentar el valor de predicción, diagnóstico o control de INS-SP. En el caso de TCA, rechazo de trasplante cardíaco o TCA/trastorno pulmonar combinar los niveles de marcador INS-SP con marcadores cardíacos conocidos puede aumentar el valor predictivo o de diagnóstico de un resultado del paciente.

40 El análisis de un número de marcadores peptídicos puede realizarse simultáneamente o por separado usando una sola muestra de ensayo. Se prefieren ensayos simultáneos, de formato de dos o múltiples sitios. Son particularmente útiles sistemas múltiples de perlas, microensayo o biochip. Las perlas, ensayos o chips pueden tener un número de ubicaciones individuales, con frecuencia direccionables, que comprenden un anticuerpo frente a uno o más marcadores que incluyen INS-SP y fragmentos de INS-SP. El uno o más marcadores incluyen más de un marcador
45 de INS-SP. Por ejemplo, puede ser útil someter a ensayo fragmentos INS-SP N-terminales y C-terminales y combinar los resultados del ensayo. Muchas otras combinaciones de dichos marcadores son factibles. El documento US2005/0064511, el documento US 6019944 y Ng y Hang, *J. Cell Mol. Med.*, 6: 329-340 (2002) proporcionan una divulgación de micromatrices, chips, dispositivos capilares y técnicas útiles en la presente invención. Luminex proporciona un sistema múltiple de perlas útil en la presente invención. Véase también *The Protein Protocols Handbook*, citado anteriormente. Los analizadores de laboratorio adecuados para su uso con ensayos separados o
50 secuenciales incluyen AxSym (Abbott, EE.UU.), Elecsys (Roche), Access (Beckman), ADVIA CENTAUR® (Bayer) y el sistema de inmunoensayo Nichols Advantage® (Nichols Institute).

55 En un aspecto se realizan ensayos simultáneos de una pluralidad de polipéptidos en una sola superficie tal como un chip o matriz.

En otro aspecto se realizan ensayos separados de uno o más marcadores no INS-SP y los resultados se cotejan o se combinan con los resultados de biomarcadores INS-SP.

60 Cuando se ha de controlar un sujeto, puede tomarse una serie de muestras biológicas en el tiempo. El muestreo en serie permite que se midan los cambios en los niveles de marcadores, en particular de los biomarcadores INS-SP, en el tiempo. El muestreo puede proporcionar información sobre el tiempo de inicio aproximado de un acontecimiento y la gravedad del acontecimiento, puede indicar qué pautas terapéuticas pueden ser apropiadas, la respuesta a las pautas terapéuticas empleadas o el pronóstico a largo plazo. Pueden realizarse análisis en los
65 puntos de atención, tales como en ambulancias, consultorios médicos, en la presentación clínica, durante la estancia en el hospital, en pacientes ambulatorios o durante la exploración rutinaria.

Los métodos de la invención también pueden realizarse junto con un análisis de uno o más factores de riesgo, tales como, pero no limitados a edad, peso, nivel de actividad física, sexo y antecedentes familiares de acontecimientos tales como diabetes, trastornos del manejo de la glucosa y acontecimientos cardíacos. Los resultados de ensayo también pueden usarse junto con los métodos de la invención. Por ejemplo, los ensayos de tolerancia a la glucosa, los resultados del ECG y el examen clínico. Un cambio estadísticamente significativo en el nivel de INS-SP circulante, junto con uno o más factores de riesgo o resultados de ensayo adicionales pueden usarse para diagnosticar con más exactitud o pronosticar el estado del sujeto.

Los métodos del presente documento también pueden usarse como guía para la terapia. Por ejemplo, qué terapias iniciar y cuándo, control de la terapia, detección de efectos positivos o adversos de la terapia, por ejemplo, toxicidad cardíaca por fármacos antimitóticos, insulina, manejo de la glucosa, concentraciones de triglicéridos y ácidos grasos, metformina y/o terapia con estatinas y ajuste de pautas terapéuticas si y cuando sea necesario dependiendo de los resultados. Esto puede mejorar los resultados a corto, mediano y largo plazo para los pacientes. Para una guía para los tratamientos véase Troughton et al.⁸

Trastornos cardíacos agudos

Los solicitantes han demostrado que las concentraciones de biomarcador INS-SP tal como INS-SP (1-9) se correlacionan con trastornos cardíacos agudos. Además, los niveles de biomarcadores INS-SP están en su nivel más alto tras la presentación clínica en el caso de pacientes que se presentan con sospecha de infarto agudo de miocardio (IAM) o ataque al corazón. Los pacientes que se presentan con trastornos cardíacos agudos y, en particular, arteriopatía coronaria por isquemia cardíaca aguda provocada por (ataque al corazón dejando cicatrices en el músculo cardíaco o miocardio), pueden o no puede experimentar un infarto de miocardio (IM) posterior. El grupo que no experimenta IM no puede diagnosticarse fácilmente usando técnicas y marcadores clínicos actuales. Por primera vez, los solicitantes han proporcionado, por tanto, un marcador precoz y específico útil para el daño miocárdico asociado al IM. Esto puede permitir el diagnóstico precoz del daño miocárdico debido a eventos adversos (EA) y permitir a un médico distinguir estos casos de otros síndromes coronarios agudos, así como de otras causas de dolor torácico. Por ejemplo, la angina de pecho, la enfermedad gastrointestinal, los trastornos pulmonares/pleurales y similares. Esto acorta significativamente la ventana de 6 horas a 12 horas que se experimenta actualmente en espera de la elevación de los niveles de los biomarcadores cardíacos actuales, tales como mioglobina, CK-MB, TnT y TnI. Por tanto, puede efectuarse un diagnóstico más preciso y puede realizarse un tratamiento antes, reduciendo la morbilidad y la mortalidad y proporcionando mejores resultados pronósticos.

En otro aspecto, la invención tiene una aplicación en el control del tratamiento por reperfusión en pacientes cardíacos. El tratamiento por reperfusión incluye habitualmente la intervención coronaria percutánea (por ejemplo, angioplastia) y/o el tratamiento farmacológico. Se emplean habitualmente en el tratamiento farmacológico fármacos trombolíticos para la revascularización. Las terapias adyuvantes incluyen las terapias anticoagulante y antiplaquetaria. El tratamiento por reperfusión es más eficaz cuando se emplea tan pronto como sea posible después del diagnóstico. El ensayo de INS-SP acelera el diagnóstico y permite la introducción inmediata del tratamiento por reperfusión. La eficacia del tratamiento también puede controlarse mediante repetición del ensayo y el ajuste de la terapia según sea apropiado. Para un análisis exhaustivo del tratamiento por reperfusión véase Braunwald et al. en el presente documento¹.

Enfermedad cardíaca

Los métodos de la invención también pueden ser útiles para diagnosticar o predecir la enfermedad cardíaca en un sujeto.

Rechazo del trasplante cardíaco

La invención también tiene aplicaciones en el control del rechazo del trasplante de corazón, habitualmente un trasplante de aloinjerto cardíaco, a través de la biopsia regular de tejido durante y después del trasplante usando mediciones de biomarcador INS-SP. Un aumento en los niveles de biomarcador INS-SP medidos a las seis, cuatro o dos horas, del trasplante de corazón con respecto a un nivel de control puede ser predictivo o diagnóstico de un episodio de rechazo.

La presente invención también proporciona un ensayo para detectar biomarcadores INS-SP en una muestra de sangre, plasma o suero. En una realización la muestra se obtiene de un sujeto aproximadamente a las seis, cuatro o dos horas desde el inicio o aproximadamente a las seis, cuatro o dos horas desde presentación clínica con SCA.

El ensayo comprende detectar y medir el nivel de biomarcador INS-SP en la muestra usando el anticuerpo de la invención. En una realización, el ensayo es un ensayo in vitro. Dichos métodos incluyen todas las técnicas de ensayo conocidas analizadas anteriormente, así como técnicas de electroforesis en gel, transferencia Western, espectroscopia de fase gaseosa, microscopía de fuerza atómica, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, pero no se limitan a las mismas³.

- En un aspecto el ensayo comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos que se unen a una o más de las secuencias de ácido nucleico del biomarcador INS-SP de la invención. Puede diseñarse una amplia gama de sondas y cebadores sentido y antisentido a partir de las secuencias de ácido nucleico del presente documento. El nivel de expresión de la secuencia de biomarcador INS-SP se identifica usando técnicas conocidas analizadas anteriormente. La matriz puede ser un sustrato sólido, por ejemplo, un "chip" como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 5.744.305 o una membrana de nitrocelulosa. Para un análisis de las matrices útiles véase, por ejemplo, *Microarray Technology and its Application*, Müller, U et al., Springer 2005, y *Gene Expression Profiling by Microarrays: Clinical Implications*, Hofmann, W-K; Cambridge University Press 2006.
- Las proteínas expresadas por el biomarcador INS-SP en el presente documento también pueden usarse en ensayos y los resultados pueden compararse con los niveles de expresión de la misma proteína expresada en una muestra de control normal. La presencia y la cantidad de proteína pueden evaluarse usando formatos de ensayo conocidos en la técnica y analizados en el presente documento.
- La presencia de biomarcador INS-SP se detecta preferentemente en la muestra mediante la unión del biomarcador INS-SP a un agente de unión tal como un anticuerpo de la invención y la medición de la presencia de la cantidad de biomarcador INS-SP unido.
- Como se ha señalado anteriormente, los anticuerpos que se unen o se unen selectivamente a INS-SP incluyendo variantes y fragmentos de los mismos, forman un aspecto adicional de la invención y los anticuerpos pueden prepararse mediante las técnicas analizadas anteriormente. Los anticuerpos son útiles en los métodos y ensayos de la invención.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA), (que comprende un agente de unión a biomarcador INS-SP (o agentes de unión para múltiples biomarcadores INS-SP) incluyendo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Cuando el kit es para su uso en el diagnóstico de SCA, la muestra de sangre, plasma o suero, en una realización, se obtiene, por ejemplo, de un sujeto a las seis, cuatro o dos horas de la aparición o la presentación clínica con SCA.
- La invención también proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA), rechazo de trasplante cardíaco o un TCA/trastorno pulmonar que comprende un agente de unión de la invención, en la que el kit está calibrado para medir niveles de INS-SP en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 pmol/l, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 pmol/l, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 pmol/l.
- La calibración de los ensayos puede efectuarse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, usando muestras de sangre con niveles conocidos de biomarcador INS-SP o un conjunto de calibrados con diferentes niveles conocidos de INS-SP en cada uno. Las tiras de ensayo para su uso en kits de diagnóstico se calibran habitualmente durante la fabricación. Véase, por ejemplo, el documento US 6.780.645. El kit es útil para medir el nivel de biomarcador INS-SP en una muestra biológica. Los reactivos de detección pueden ser secuencias oligonucleotídicas complementarias a INS-SP o un fragmento del marcador INS-SP, o anticuerpos que se unen a los polipéptidos codificados por el marcador. Los reactivos pueden estar unidos a una matriz sólida como se ha analizado anteriormente o pueden estar empaquetados con reactivos para unirlos a la matriz. La matriz o el sustrato sólidos pueden estar en forma de perlas, placas, tubos, tiras reactivas, tiras o biochips, todos como se han analizado 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 incluirá también, convenientemente, un reactivo de control (positivo y/o negativo) y/o un medio para detectar el ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo. También pueden incluirse instrucciones de uso con el kit, tales como la toma de una muestra biológica de un sujeto a las seis, cuatro o dos horas de la aparición o la presentación con TCA, rechazo de trasplante cardíaco o TCA/trastorno pulmonar, la medición del nivel de INS-SP en la muestra, comparando el mismo con un nivel de control y asociando el resultado con la función cardíaca. Generalmente un aumento en el nivel del marcador INS-SP de un control es indicativo de TCA o rechazo de trasplante cardíaco, o TCA en contraposición a un trastorno pulmonar.
- En el caso de la diabetes un nivel de marcador biomarcador INS-SP inferior o superior con respecto a un control es indicativo de diabetes o una predisposición a la misma, si es mayor o menor dependiendo de la naturaleza de la diabetes y el estado diabético del sujeto.
- Más por lo general, los kits tendrán un formato para ensayos conocidos en la técnica y, en una realización, para PCR, hibridación Northern o ensayos ELISA Southern, como se conocen en la técnica.
- Los kits también pueden incluir uno o más ensayos adicionales para determinar marcadores para TCA, rechazo de trasplante o TCA/trastornos pulmonares. En el caso de SCA el ensayo de marcador adicional puede incluir un

ensayo o ensayos para uno o más de troponina, troponina T, troponina I, creatina cinasa MB, mioglobina, BNP, BNP-SP, fragmentos de BNP-SP, ANP, ANP-SP, fragmentos de ANP-SP, NT-BNP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, albúmina modificada por isquemia, renina y angiotensina II. En una realización todos los marcadores están incluidos en el kit.

5 En el caso de la diabetes los componentes del kit adicionales pueden ser medios de medición para marcadores que pueden incluir insulina, glucosa, lactato, triglicéridos y ácidos grasos o marcadores de los mismos.

10 El kit comprenderá uno o más recipientes y también puede incluir equipos de extracción, por ejemplo, botellas, bolsas (tales como bolsas de fluidos intravenosos), viales, jeringas y tubos de ensayo. Al menos un recipiente contiene un producto que es eficaz para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento biológico, tal como la diabetes, TCA (en particular SCA), rechazo de trasplante o TCA/trastorno pulmonar. El producto generalmente es una molécula de ácido nucleico, polipéptido o un agente de unión, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención o una composición que comprende cualquiera de estos. En una realización preferida, una instrucción o etiqueta sobre o asociada al recipiente indica que la composición se usa para predecir, diagnosticar o controlar el acontecimiento biológico. Otros componentes pueden incluir agujas, diluyentes y tampones. De manera útil, el kit puede incluir al menos un recipiente que comprende un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de dextrosa y solución de Ringer.

20 En el kit se incluyen deseablemente agentes de unión que se unen o se unen selectivamente a un biomarcador INS-SP (y, opcionalmente, un biomarcador no INS-SP). En una realización, el agente de unión es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. El anticuerpo utilizado en los ensayos y kits puede ser, en una realización, un anticuerpo monoclonal o policlonal y puede prepararse en cualquier mamífero como se analizado anteriormente. Los anticuerpos pueden prepararse contra un péptido nativo codificado o indicado por una secuencia de ácido nucleico de biomarcador INS-SP de la invención, INS-SP (1-24), INS-SP (1-9), INS-SP (15-24) o un péptido sintético a base del mismo o que comprenda el mismo, o pueden generarse contra una secuencia exógena fusionada con una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de biomarcador de INS-SP de la invención.

30 En un kit, un reactivo de detección de biomarcador INS-SP se inmoviliza sobre una matriz sólida tal como una tira porosa o chip para formar al menos un sitio de detección de biomarcador INS-SP. La región de medición o detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios de detección, conteniendo dichos sitios de detección un reactivo de detección de biomarcador INS-SP. Los sitios pueden disponerse en una disposición de barra, cruz o punto, u otra. Una tira de ensayo o un chip también pueden contener sitios para controles negativos y/o positivos. Los sitios de control pueden estar, como alternativa, en una tira o chip diferente. Los sitios de detección diferentes pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos o anticuerpos inmovilizados, por ejemplo, una cantidad más alta en el primer sitio de detección y cantidades más bajas en los sitios posteriores. Tras la adición de una muestra biológica de ensayo el número de sitios que muestran una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa o semi-cuantitativa de la cantidad de biomarcador INS-SP presente en la muestra.

40 En el kit también puede incluirse un dispositivo para el análisis de la muestra que comprende un cartucho de ensayo desechable con componentes apropiados (marcadores, anticuerpos y reactivos) para realizar ensayos de las muestras. El dispositivo incluirá convenientemente una zona de ensayo y una ventana de resultado del ensayo. Son ejemplos de dichos dispositivos los cartuchos inmunocromatográficos. Véase, por ejemplo, el documento US 6.399.398; el documento US 6.235.241 y el documento US 5.504.013.

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

55 En la presente memoria descriptiva, en la que se ha hecho referencia a memorias descriptivas de patente, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto es generalmente con el fin de proporcionar un contexto para el análisis de las características de la invención. A menos que se indique específicamente lo contrario, la referencia a dichos documentos externos no ha de interpretarse como una admisión de que dichos documentos; o dichas fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica anterior o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

60 La invención se ilustrará ahora de una manera no limitante por referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

MÉTODOS

65

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

Productos químicos

5 Se sintetizaron péptidos señal de INS humanos sintéticos INS-SP (1-9) e INS-SP (15-24) (SEQ ID NO: 16 y 18) mediante mimotopos (Australia) usando un método de síntesis en fase sólida suave por Fmoc³⁰. Todos los reactivos tamponantes se adquirieron de BDH® (Reino Unido) y/o Sigma (Mo, EE.UU.). INS-SP (1-9) e INS-SP (15-24) se sintetizaron con cisteína para el acoplamiento de soporte direccional. Ambos péptidos también se sintetizaron con un
10 resto tirosilo para la preparación de indicador en el mismo péptido.

Estudios en seres humanos

15 Para el estudio del *valor de referencia en voluntarios sanos*, se obtuvieron muestras de sangre venosa de 20 voluntarios sanos (13 mujeres, edad promedio $48,8 \pm 3,2$ años (intervalo de 21-72 años), IMC $25,9 \pm 1,0$ kg/m²) después de una noche de ayuno. Las muestras se tomaron en tubos en hielo y se centrifugaron a $+4,0$ °C a 2700 g durante 5 minutos y el plasma se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

20 Para el análisis de las concentraciones de biomarcador INS-SP en *la lesión cardíaca aguda*, se estudiaron 9 pacientes consecutivos (4 mujeres, con una edad promedio de 70 ± 8 años (intervalo de 59-79 años)), que se presentaron en la Unidad Coronaria del Hospital de Christchurch 6 horas después de la aparición de dolor torácico y pruebas claras IM agudo con elevación del segmento ST, junto con un aumento y después disminución de la troponina T plasmática (TnT). Se excluyeron las pacientes con shock cardiogénico. A las nueve pacientes se les realizó un ECG durante la estancia en el hospital. El tiempo entre la aparición del dolor torácico y la extracción de la
25 muestra venosa basal (tiempo 0) fue de $3,7 \pm 0,2$ horas. Se insertó una cánula intravenosa de calibre 18 en una vena del antebrazo para el muestreo de sangre. Las muestras venosas (10 ml) se extrajeron en la admisión en la Unidad Coronaria (tiempo 0) y después de esto a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 72 horas como pacientes ingresadas. Se tomaron muestras en los tubos en 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

30 Todas las muestras de plasma se extrajeron en Cartuchos SepPak, (Waters, EE.UU.) como se ha descrito anteriormente²², se secaron y se almacenaron a -20 °C antes de RIA y HPLC.

RIA de INS-SP

35 Para la medición de péptidos biomarcadores INS-SP humanos supuestos, los inventores generaron nuevos RIA de IR dirigidos contra los aminoácidos INS-SP 1-9 (SEQ ID NO: 16) y 15-24 (SEQ ID NO: 18) de la secuencia señal (SEQ ID NO: 14) de la preproinsulina humana (1-24).

Generación de anticuerpos

45 Se acoplaron preproINS(1-9)^{Cys10} y (15-24)^{Cys14} a BSA derivatizada con éster de N-e-maleimidocaproiloxi succinimida (EMCS) tratada con maleimida en PBS (pH 7,0) mediante mezcla suave 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 New Zealand en 4-5 sitios a intervalos mensuales. Los conejos se desangraron 12 días después de la inyección para evaluar los títulos de anticuerpos hasta que se consiguieron niveles adecuados. Para RIA, se determinó IR de INS-SP usando antisuero a una dilución final de 1:30.000.

Yodación y método de ensayo

50 Se yodaron preproINS (1-9) y (15-24) con restos de tirosilo acoplados mediante el método de la Cloramina T y se purificaron en HPLC de fase inversa (RP-HPLC) como se ha descrito anteriormente²¹. A partir de esta preparación se sometió a ensayo un indicador yodado formado después de la RP-HPLC. Todas las muestras, patrones, indicadores radiactivos y soluciones de antisuero se diluyeron en tampón de ensayo a base de potasio.²² El incubado de ensayo consistió en 100 µl de muestra o patrón (preproINS humana 0-640 pmol (1-10) o (15-24)), combinado con 100 µl de antisuero que se agitaron con formación de vórtice y se incubaron a 4 °C durante 24 horas. Después se añadieron 100 µl de indicador (4000-5000 cpm) y se incubaron adicionalmente durante 24 horas a 4 °C.
60 Por último, se separaron las inmunoreactividades libres y unidas mediante el método del segundo anticuerpo en fase sólida (Sac-Cel® anti-oveja de burro, IDS Ltd, Inglaterra) y se contaron en un contador Gammamaster (LKB, Uppsala, Suecia).

Análisis estadístico

5 Todos los resultados se presentan como media \pm ETM. Se analizaron los datos de curso temporal usando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas seguida de ensayo a posteriori de diferencia menos significativa. El análisis de correlación de concentraciones de hormonas plasmáticas se realizó usando un modelo de regresión lineal general. En todos los análisis, un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

10 Para determinar si el péptido señal de 24 aminoácidos de insulina, o fragmentos derivados de él, están presentes en la circulación de los seres humanos, los inventores desarrollaron un radioinmunoensayo específico (RIA) dirigido contra los restos 1-9 y 15-24 de la preproinsulina (1-24). La dilución de los extractos plasmáticos demuestra un paralelismo con la curva patrón (no mostrada). Las concentraciones plasmáticas de biomarcador INS-SP en los seres humanos sanos fueron de $8,8 \pm 2,6$ pmol/l ($n = 20$) (Figura 1).

15 Habiéndose establecido que están presentes péptidos IR de INS-SP (1-9) en el plasma humano, los inventores después midieron concentraciones en serie de IR de INS-SP en pacientes con IAM documentado ($n = 9$, Figura 2). Se observaron concentraciones mayores de IR de INS-SP en la admisión hospitalaria y lentamente disminuyeron a niveles estables durante 12 a 72 horas. Es importante destacar que los niveles máximos promedio en la admisión fueron de cinco a quince veces superiores a los niveles normales en voluntarios sanos.

20 Preferentemente, se detectan fragmentos de IR de INS-SP.

EJEMPLO 2

25 Se les insertó un catéter a seis pacientes con sospecha de SCA clínicamente estable y se obtuvieron muestras de sangre de múltiples sitios orgánicos: estos fueron la arteria femoral FA(1) y la vena femoral (FV) FA(2), la vena renal (RV), la vena hepática (HV), la vena cava inferior (IVC), la vena yugular (JUG), la vena sinusal coronaria cardíaca (CS) y la arteria pulmonar (AP). La sangre se recogió en tubos con EDTA refrigerados, preparados a partir de plasma por centrifugación y el plasma se sometió a RIA de INS-SP. La Figura 2 muestra que los sitios más altos de concentración de biomarcador INS-SP son las venas yugular, renal y femorales.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

35 Para evaluar el papel que INS-SP puede tener en el control del metabolismo y/o el equilibrio de energía, a 7 voluntarios sanos normales se les proporcionaron 75 g de glucosa oral. Como puede observarse en la Figura 3, los niveles de biomarcadores INS-SP en plasma se redujeron significativamente después de la ingestión de glucosa, en consonancia con que tiene un papel en el equilibrio de energía. Por el contrario, las concentraciones plasmáticas de insulina aumentaron significativamente después de la ingestión de glucosa, sugiriendo fuertemente puntos de contraste entre los dos péptidos en el control del equilibrio de energía.

Conclusión

45 Las concentraciones circulantes de biomarcador INS-SP en pacientes clínicamente estables derivan probablemente de fuentes yugulares, renales o periféricas. El aumento de péptidos y subpéptidos de INS-SP en respuesta a un IAM documentado apoya la idea de que tienen un papel como biomarcador de enfermedad metabólica y cardíaca. La respuesta de los niveles plasmáticos de biomarcador INS-SP a aumentos en la glucosa plasmática también sugiere que puede tener un papel en el equilibrio de la energía.

DISCUSIÓN

50 Esta evidencia es la primera en documentar que el péptido señal de preproinsulina, y fragmentos del mismo, está presente en la circulación y el espacio extracelular. Los inventores muestran en primera instancia que la medición de IR de INS-SP en sangre tiene potencial como biomarcador rápido de la isquemia cardíaca aguda y/o la posterior lesión y, en segunda instancia, que la medición de INS-SP después del acontecimiento tiene mérito potencial como marcador de pronóstico y resultado a largo plazo.

55 Los inventores también demuestran que la medición en plasma de un biomarcador INS-SP tiene un uso potencial en el ámbito del metabolismo y/o el equilibrio de energía, especialmente en la evaluación del manejo de la glucosa. Los expertos en la materia por supuesto apreciarán que la descripción anterior se proporciona a modo de ejemplo y que la invención no se limita a la misma.

REFERENCIAS

65 1. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Acute myocardial infarction*, Capítulo 35, *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, 6ª ed. 2001. páginas 1114-1231.

2. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. *Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. Circulation* 1998 97: 1921-1929.
- 5 3. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. *N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. J. Am. Coll. Cardiology* 2002 40: 437-445.
- 10 4. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, Hartford M, Caidahl K. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. Circulation.* 2002 106: 2913-2918.
- 15 5. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. *Deconvolution Analysis of the Secretion and Elimination of Cardiac Natriuretic Peptides During Acute Volume Overload. Hypertension* 2000;36: 355-359.
6. Richards AM, Nicholls MG, Troughton RW, Lainchbury JG, Elliott J, Frampton C, Espiner EA, Crozier IG, Yandle TG, Turner J. *Antecedent hypertension and heart failure after myocardial infarction. J. Am. Coll. Cardiology.* 2002 39: 1182-1188.
- 20 7. Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, Martin M, Fogarty A, Morehead A, Yandle TG, Richards AM, Starling RC, Young JB, Thomas JD, Klein AL. *Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. J Am Coll Cardiol.* 2004 43: 416-422.
- 25 8. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. *Treatment of heart failure guided by plasma amino-terminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. Lancet* 2000 355: 1126-1130.
9. *Multiple Sequence Alignment with the Clustal series of programs Nucleic Acids Res* (2003) 31 (13): 3497-500.
- 30 10. Bowie, J.U et al., (1990). *Deciphering the message in Protein Sequences: Tolerance to amino Acid Substitutions. Science* 247, 1306-1310.
11. Harbour y Lane 1998. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press New York.²⁷
- 35 12. Kohler y Milstein 1975. *continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. Nature*, 256, 495-497.
13. Verhoeyen M. C Milstein y G Winter *Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. Science* 25 de marzo de 1988; 239 (4847): 1534-6.
- 40 14. Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S. y Winter, G. *"Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse". Nature* (1986) 321: 522-525.
- 45 15. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. *Reshaping human antibodies for therapy. Nature.* 24 de marzo de 1988; 332 (6162): 323-7.
16. Hoogenboom HR, Winter G (1992) *Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. J Mol Biol.* 20 de septiembre de 1992; 227 (2): 381-8.
- 50 17. Michael Neuberger (1996) *Generating high-avidity human Mabs in mice Nature Biotechnology* 14, 826
18. Tristan J. Vaughan, Jane K. Osbourn y Philip R. Tempest (1998) *Human antibodies by design. Nature Biotechnology* 16, 535-539
- 55 19. Milstein y Cuello (1983) *The co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities, Nature*, 305: 537-539.
20. Suresh, M. R., Cuello, A. C. y Milstein, C. (1986) *Bi-specific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. Methods in Enzymology*, 121: 210-228.
- 60 21. Brennan et al., *"Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments" Science* 229: 81-83 (1985).
- 65 22. Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. *Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. Clin. Endocrinol.* 1997 47: 287-296.

23. *The Immunoassay Handbook*. 3ª edición, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005.

5 24. Solber H. *Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. Journal of clinical Chemistry and Cilinical Biochemistry* 1987 25: 645-656.

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

15 26. *Universal definition of myocardial infarction. Consensus statement from the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Taskforce for the redefinition of myocardial infarction. Circulation* 2007 116: 2634-2653.

20 27. *National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for standardisation of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. Circulation* 2007 115: e352-e355.

25 28. Kunkel, Thomas A. *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 82, páginas 488-492, enero de 1985.

30 29. *Techniques in Protein Modification* de Roger L. Lundblad Edición: 2 Publicado por CRC Press, páginas 1995 288.

35 30. Atherton et al. (1989) *Solid Phase Synthesis: a practical approach*, IRL press.

40 31. Skyler JS. *Non-insulin-dependent diabetes mellitus: a clinical strategy. Diabetes Care.* Mayo-junio de 1984; Supl. 7 1L118-29.

LISTADO DE SECUENCIA

30 <110> OTAGO INNOVATION LIMITED

<120> Biomarcadores

35 <130> N.111777

<140> EP 09719459.1

<141> 12-03-2009

40 <150> US 61/035.770

<151> 12-03-2008

<160> 20

45 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<300>

<308> NP_000198

<309> 02-03-2008

55 <313> (1)..(110)

<400> 1

ES 2 666 725 T3

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
 50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100 105 110

5 <210> 2
 <211> 469
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <308> NM_000207
 <309> 02-03-2008
 <313> (1)..(469)

<400> 2

agccctccag gacaggctgc atcagaagag gccatcaagc agatcactgt ctttctgcca 60
 tggccctgtg gatgcgcctc ctgcccctgc tggcgctgct ggccctctgg ggacctgacc 120
 cagccgcagc ctttgtgaac caacacctgt gcggtcaca cctggtggaa gctctctacc 180
 tagtgtgcg ggaacgaggc ttctttctaca cacccaagac ccgccgggag gcagaggacc 240
 tgcaggtggg gcaggtggag ctgggcgggg gccctggtgc aggcagcctg cagcccttgg 300
 ccctggaggg gtccttgag aagcgtggca ttgtggaaca atgctgtacc agcatctgct 360
 ccctctacca gctggagaac tactgcaact agacgcagcc cgcaggcagc cccacaccg 420
 15 ccgcctcctg caccgagaga gatggaataa agcccttgaa ccagcaaaa 469

20 <210> 3
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

ES 2 666 725 T3

<300>
 <308> NP_062002
 <309> 11-02-2008
 <313> (1)..(110)

5 <400> 3

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1           5           10           15

Trp Glu Pro Lys Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
 20           25           30

Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35           40           45

Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Pro
 50           55           60

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Glu Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
 65           70           75           80

Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
 85           90           95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100          105          110
  
```

10 <210> 4
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

15 <300>
 <308> NM_019129
 <309> 11-02-2008
 <313> (1)..(441)

20 <400> 4

```

cagctacaat catagaccat cagcaagcag gtcattgttc caacatggcc ctgtggatgc      60
gcttctgcc cctgctggcc ctgctcgtcc tctgggagcc caagcctgcc caggcttttg      120
tcaaacagca cctttgtggt cctcacctgg tggaggctct gtacctggtg tgtggggaac      180
gtggtttctt ctacacacce aagtcccgtc gtgaagtgga ggaccgcaa gtgccacaac      240
tggagctggg tggaggcccg gaggccgggg atcttcagac cttggcactg gaggttgccc      300
ggcagaagcg tggcattgtg gatcagtgtc gcaccagcat ctgctccctc taccaactgg      360
agaactactg caactgagtc caccactccc cgcccccccc tctgcaatga ataaagcctt      420
tgaatgagca ccaaaaaaaaa a                                          441
  
```

ES 2 666 725 T3

<210> 5
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Ovis aries
 5
 <300>
 <308> AAB60625
 <309> 23-08-2002
 <313> (1)..(105)
 10
 <400> 5
 Met Ala Leu Trp Thr Arg Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Ala Pro Ala His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20 25 30
 Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Val Glu Gly Pro Gln Val Gly
 50 55 60
 Ala Leu Glu Leu Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Leu Glu Gly Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Gly Val Cys Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100 105

15 <210> 6
 <211> 397
 <212> ADN
 <213> Ovis aries
 20 <300>
 <308> AH005355S1
 <309> 23-08-2002
 <313> (1)..(397)
 25 <400> 6
 tgccctcagg accggctgca ttcgaggctg tcagcaaaca ggtcctcgca agcccgccat 60
 ggccctgtgg acacgcctgg tgccctgct ggccctgctg gcaactctggg cccccgcccc 120
 ggcccacgcc ttcgtcaacc agcacctgtg cggctcccac ctggtggagg cgctgtacct 180
 ggtgtgcgga gagcgcggt tcttctacac gcccaggcc cgccgggagg tggagggccc 240
 ccaggtgggg gcgctggagc tggccggagg ccccggcgcg ggtggcctgg aggggcccc 300
 gcagaagcgt ggcacgtgg agcagtgtg cgcggcgctc tgctctctct accagctgga 360
 gaactactgt aactagacct ggcccgcgc caataaa 397

ES 2 666 725 T3

<210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

5

<300>
 <308> NP_00110342
 <309> 21-09-2008
 <313> (1)..(469)

10

<400> 7

```

Met Ala Leu Trp Thr Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1                               10                          15

Trp Ala Pro Ala Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20                          25                          30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35                          40                          45

Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Ala Glu Asn Pro Gln Ala Gly
 50                          55                          60

Ala Val Glu Leu Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gln Ala Leu Ala Leu
 65                          70                          75                          80

Glu Gly Pro Pro Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 85                          90                          95

Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100                          105
  
```

15

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<300>
 <308> NP_032412
 <309> 24-02-2008
 <313> (1)..(108)

25

<400> 8

ES 2 666 725 T3

Met Ala Leu Leu Val His Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Trp Glu Pro Lys Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
 20 25 30

Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Glu
 50 55 60

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Gly Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser
 85 90 95

Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100 105

<210> 9
 <211> 1116
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<300>
 <308> NM_008386
 <309> 24-02-2008
 <313> (1)..(1116)

10

<400> 9

ES 2 666 725 T3

```

cttcagcccc tctggccatc tgcctaccca cccacactgg agaccttaat gggccaaaca      60
gcaaagtcca gggggcagag aggaggtact ttggactata aagctggtgg gcatccagta      120
acccccagcc cttagtgacc agctataatc agagaccatc agcaagcagg tcattgtttc      180
aacatggccc tgttggtgca cttcctaccc ctgctggccc tgcttgccct ctgggagccc      240
aaaccaacc aggcttttgt caaacagcat ctttgtggtc cccacctggt agaggctctc      300
tacctggtgt gtggggagcg tggcttcttc tacacacca agtcccgccg tgaagtggag      360
gaccacaag tggaacaact ggagctggga ggaagccccg gggacctca gacctggcg      420
ttggaggtgg cccggcagaa gcgtggcatt gtggatcagt gctgcaccag catctgctcc      480
ctctaccagc tggagaacta ctgcaactaa ggcccacctc gaccgcccc acccctctgc      540
aatgaataaa acttttgaat aagcaccaaa aaaaagagtt ctataatgaa tgaaaaagga      600
ttgtgtatat agacatcttt ttctctggca tttattgtca tgttagcata ctattaaacc      660
attgttaggt tggatgatta tataatcatg tatgaagctt gtgataaac accaggaata      720
attcaagtat ctggaattct gcttctgcc caagaaggta ggcaaccgtg taaatgccac      780
tgaagctact agtctaaaag tgagttatct ctgtctttgt cttaccocct gatgctgtga      840
taaaaccctg acaagagcaa ctgactcctg agaggaaggt ttattctagc tcacaattcc      900
aggttacaaa cagtccatcc gtagcagggg agtcacagca acaggaacct cagggaaactg      960
ctcctattat cccacaatc aagaatagtg accaataaat aagtggatct tttctc      1116

```

<210> 10
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<300>
 <308> NP_00123565
 <309> 30-08-2005
 <313> (1)..(110)

<400> 10

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1           5           10           15

```

5

10

15

ES 2 666 725 T3

Trp Ala Pro Ala Pro Thr Arg Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Val Glu Asp Leu Gln Val Arg
 50 55 60

Asp Val Glu Leu Ala Gly Ala Pro Gly Glu Gly Gly Leu Gln Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ala Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100 105 110

5 <210> 11
 <211> 463
 <212> ADN
 <213> Canis familiaris

10 <300>
 <308> NM_001130093
 <309> 30-08-2005
 <313> (1)..(463)

<400> 11

caccccgaca cggccggcaa acaggtcgcc atggccctct ggatgcgcct cctgcccctg 60
 ctggccctgc tggccctctg ggcgcccgcg cccacccgag ccttcgttaa ccagcacctg 120
 tgtggctccc acctggtaga ggctctgtac ctgggtgtgcg gggagcgcgg cttcttctac 180
 acgcctaagg cccgcaggga ggtggaggac ctgcaggtga gggacgtgga gctggccggg 240
 gcgcctggcg agggcggcct gcagcccctg gccctggagg gggccctgca gaagcgaggc 300
 atcgtggagc agtgctgcac cagcatctgc tccctctacc agctggagaa ttactgcaac 360
 taggggcgcg gggggcagga cgtggcagca cctgctgcag gtcacggtgg cgcgaagcct 420
 15 tcggctctct gcacccaag tgattcaata aacctctga atg 463

20 <210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Felis catus

25 <300>
 <308> NP_001009272
 <309> 30-06-2007
 <313> (1)..(110)

<400> 12

ES 2 666 725 T3

Met Ala Pro Trp Thr Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Trp Ile Pro Ala Pro Thr Arg Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Gly Lys
 50 55 60

Asp Ala Glu Leu Gly Glu Ala Pro Gly Ala Gly Gly Leu Gln Pro Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Glu Ala Pro Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85 90 95

Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu His Tyr Cys Asn
 100 105 110

5 <210> 13
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Felis catus

10 <300>
 <308> NM_001009272
 <309> 30-06-2007
 <313> (1)..(393)

<400> 13

atggccccgt ggacgcgcct cctgccctg ctggcgttgc tgtccctctg gatccctgcc 60
 ccgacccgag ccttcgtaa ccagcacctt tgtggctccc acctggtgga ggcgctgtac 120
 ctggtgtgcg gggagcgcgg cttcttctac acgccaagg cccgccgga ggcggaggac 180
 ctccagggga aggacgcgga gctgggggag gcgctggcg ccggcggcct gcagccctcg 240
 gccctggagg cccccctgca gaagcggggc atcgtggagc aatgctgtgc cagcgtctgc 300
 tcgctgtacc agctggagca ttactgcaac tagagggcgc ccggagcccg ccgcccctgc 360
 15 gcccccaacc gtccaataaa cccttgaacg agc 393

20 <210> 14
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <300>
 <308> NP_000198
 <309> 02-03-2008
 <313> (1)..(24)

<400> 14

ES 2 666 725 T3

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala
20

5 <210> 15
<211> 72
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <300>
<308> NM_000207
<309> 02-03-2008
<313> (1)..(72)

<400> 15

atggccctgt ggatgcgct cctgccctg ctggcgtgc tggccctctg gggacctgac 60
ccagccgcag cc 72
15

20 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <300>
<308> NP_000198
<309> 02-03-2008
<313> (1)..(9)

<400> 16

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro
1 5

30 <210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens
35

40 <300>
<308> NM_000207
<309> 02-03-2008
<313> (1)..(27)

<400> 17
atggccctgt ggatgcgct cctgcc 27

45 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <300>
<308> NP_000198
<309> 02-03-2008
<313> (1)..(10)

ES 2 666 725 T3

<400> 18

Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala
 1 5 10

5 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <308> NM_000207
 <309> 02-03-2008
 <313> (1)..(30)

15 <400> 19
 gccctctggg gacctgacct agccgcagcc 30

<210> 20
 <211> 324
 20 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<300>
 <308> NM_001109772
 25 <309> 21-09-2008
 <313> (1)..(324)

<400> 20

atggccctgt ggacgcgcct cctgcccctg ctggccctgc tggccctctg ggcgcccgcc 60
 ccggcccagg ccttcgtgaa ccagcacctg tgcggctccc acctggtgga ggcgctgtac 120
 ctggtgtgcg gggagcgcgg cttcttctac acgcccgaagg cccgtcggga ggcggagaac 180
 cctcaggcag gtgccgtgga gctgggcgga ggccctgggcg gcctgcaggg cctggcgctg 240
 gagggggccc cgcagaagcg tggcatcgtg gagcagtgtc gcaccagcat ctgttcctc 300
 30 taccagctgg agaactactg caac

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno aislado que se une a un fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16.
- 5 2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo policlonal, monoclonal, biespecífico, quimérico o humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 10 3. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que está marcado con un marcador detectable.
4. Uso de fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 en la preparación de un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno.
- 15 5. Un ensayo para un fragmento de péptido señal de insulina en una muestra de sangre, plasma o suero de un sujeto, comprendiendo el ensayo medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 en la muestra usando un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 6. Un ensayo para un fragmento de péptido señal de insulina de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende:
- (a) unir el fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 de una muestra de sangre, plasma o suero a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- 25 (b) medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina unido (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16, tal como mediante espectroscopia de masas, incluyendo mediante SELDI, IEN, MALDI o FTICR, o usando un ensayo seleccionado entre RIA, ELISA, ensayo inmunofluorométrico y ensayo inmunoradiométrico, en el que la medición comprende opcionalmente proporcionar una sonda de SELDI que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno fijado a un sustrato y poner en contacto el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con la muestra biológica de manera que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno captura el fragmento de péptido señal de insulina de la muestra; y medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina unido usando SELDI.
- 30 7. Un método para predecir, diagnosticar o controlar un acontecimiento biológico o trastorno en un sujeto en el que el acontecimiento o trastorno se correlaciona con la liberación de un fragmento de péptido señal de insulina en la circulación, comprendiendo el método:
- 35 (a) medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina (1-9), como se muestra en la SEQ ID NO: 16, en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto; y
- 40 (b) comparar el nivel de fragmento de péptido señal de insulina con el nivel de fragmento de péptido señal de insulina de un individuo sano de control, en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control es indicativa de un acontecimiento biológico o trastorno; y en el que
- el trastorno es un síndrome coronario agudo (SCA) y un nivel medido de fragmento de péptido señal de insulina superior al nivel de control es indicativo de SCA.
- 45 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que:
- (i) la muestra biológica se ha obtenido del sujeto en las primeras seis horas, cuatro horas o dos horas desde la aparición de, o la presentación clínica con, SCA;
- 50 (ii) un nivel de fragmento de péptido señal de insulina en la muestra en el intervalo de 40 a 250 pmol/l, de 45 a 200 pmol/l o de 50 a 150 pmol/l, es indicativo de SCA o un nivel de fragmento de péptido señal de insulina en la muestra que es de 5 a 15 veces superior al nivel de control es indicativo de SCA;
- (iii) el SCA es un infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST en la presentación del ECG o un infarto de miocardio agudo sin elevación del segmento ST; y/o
- 55 (iv) el método comprende adicionalmente medir el nivel de uno o más marcadores de fragmento de péptido señal no de insulina de dicho SCA, tales como troponina T, troponina I, creatina cinasa MB, mioglobina, ANP, ANP-SP, BNP, NT-BNP, BNP-SP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, albúmina modificada por isquemia, endotelina, adrenomedulina, renina y angiotensina II, y comparar los niveles con niveles de marcadores de un control en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control, junto con un nivel medido de INS-SP que es superior al nivel de control de fragmento de péptido señal de insulina, es predictiva o diagnóstica del SCA, o puede usarse para controlar dicho SCA.
- 60 9. Un método como se reivindica en la reivindicación 8, en el que:
- 65 (i) la etapa de medición comprende:

- (a) unir un fragmento de péptido señal de insulina con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
(b) medir el nivel de fragmento de péptido señal de insulina unido; y/o
- 5 (ii) el nivel de fragmento de péptido señal de insulina se mide usando un ensayo seleccionado entre espectroscopía de masas (incluyendo SELDI, IEN, MALDI o FTIC), RIA, ELISA, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico y ensayo inmunoradiométrico.
- 10 10. Un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno que se une a un fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 para su uso en el diagnóstico de un síndrome coronario agudo SCA en un sujeto.
- 15 11. Un kit para predecir, diagnosticar o controlar el síndrome coronario agudo (SCA) que comprende un anticuerpo de fragmento de péptido señal de insulina o fragmento de unión a antígeno que se une a un fragmento de péptido señal de insulina (1-9) como se muestra en la SEQ ID NO: 16 e instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar un síndrome coronario agudo (SCA) en un sujeto a partir del nivel de fragmento de péptido señal de insulina medido en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto.
- 20 12. Un kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que:
- (i) las instrucciones son para predecir, diagnosticar o controlar un SCA, en un sujeto en seis o cuatro horas desde la aparición o la presentación clínica, a partir del nivel de fragmento de péptido señal de insulina medido en la muestra biológica obtenida en seis o cuatro horas desde la aparición o presentación clínica con SCA; y/o
(ii) el kit se calibra para medir niveles de fragmento de péptido señal de insulina en el intervalo de 0,1 a 500 pmol/l, de 1 a 300 pmol/l o de 10 a 250 pmol/l.
- 25

IR de INS-SPn(1-9) en el Estudio IAMPS 1167, n = 9

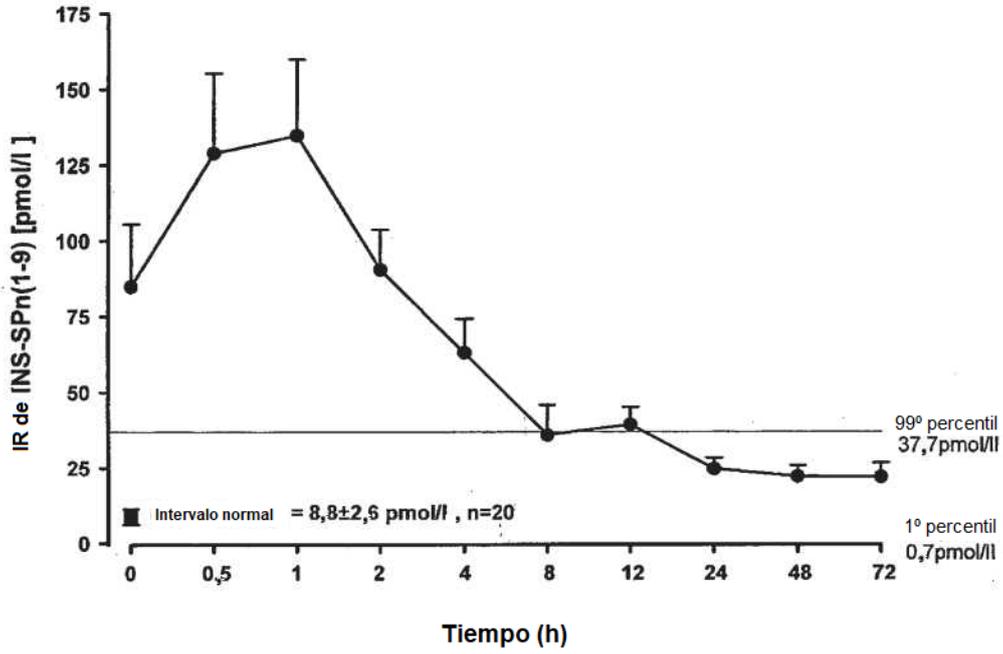


Figura 1

IR de INS-SPn(1-9) en el Estudio Regional 1129 (n = 6)

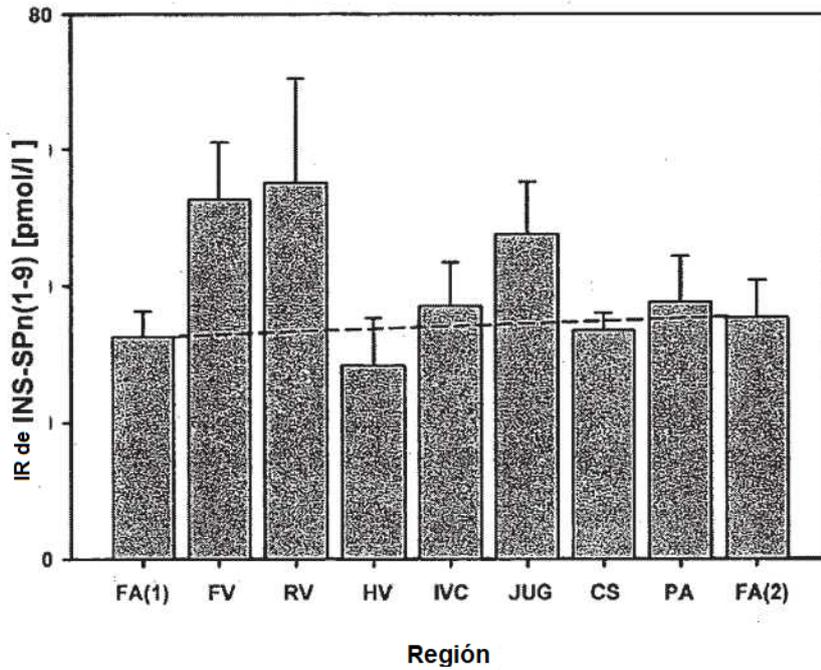


Figura 2

Concentraciones de insulina e insulina-SPn después de 75 g de glucosa oral en voluntarios sanos normales, n = 7, media ± ETM

$\psi = P < 0,001$ vs $t=0$, ANOVA de mediciones repetidas

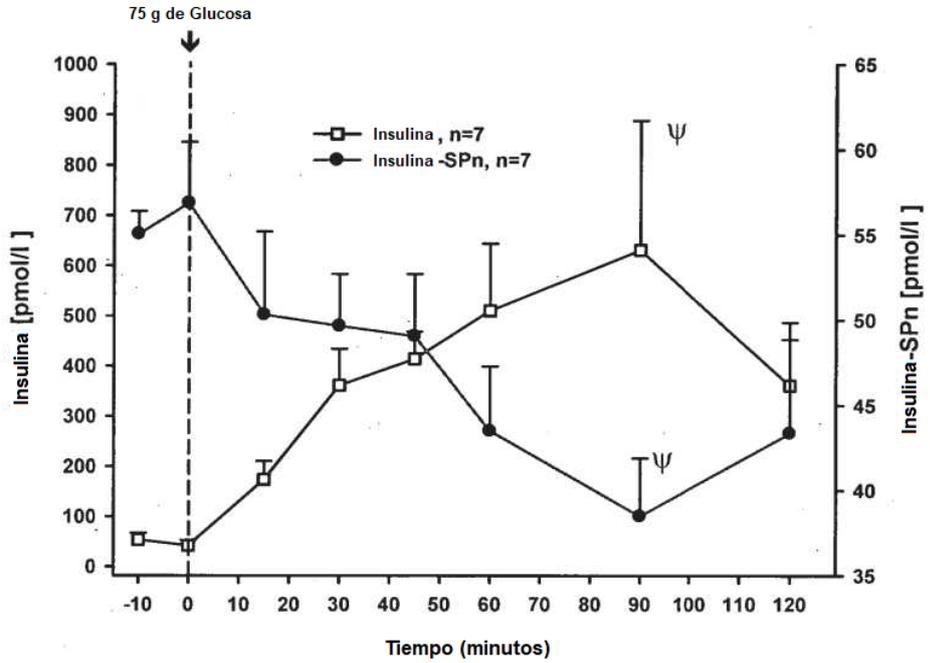


Figura 3

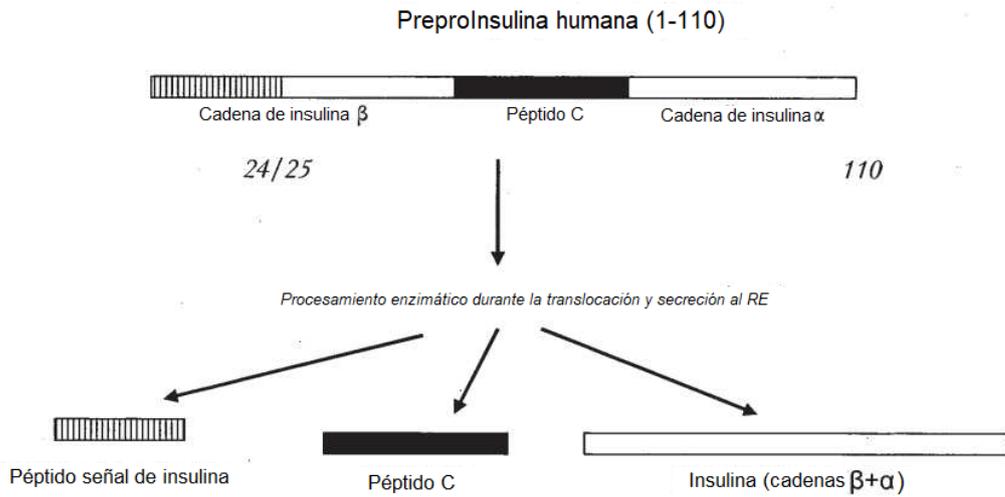


Figura 4

Homo sapiens	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA
Rattus norvegicus	MALWMRFLPLLALLVLWEPKPAQA
Ovis aries	MALWTRLVPLLALLALWAPAPAHA
Sus scrofa	MALWTRLLPLLALLALWAPAPAQA
Canis lupus familiaris	MALWMRLLPLLALLALWAPAPTRA
Felis catus	MAPWTRLLPLLALLSLWIPAPTRA
Consenso	MALWTRLLPLLALLALWAPAPARA

Figura 5