

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 648**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015 PCT/DE2015/000029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15110115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015 E 15712780 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3102602**

54 Título: **Línea celular de hibridoma y su utilización para producir un anticuerpo monoclonal contra la proteína C (proteína C, MYBPC3, CMYBP C o MY C) de unión a miosina humana específica del corazón**

30 Prioridad:

**27.01.2014 DE 102014000857**

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

**04.01.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEBER, EKKEHARD y  
MEDEK, RITA**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 800 648 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

Línea celular de hibridoma y su utilización para producir un anticuerpo monoclonal contra la proteína C (proteína-C, MYBPC3, CMYBP-C o MY-C) de unión a miosina humana específica del corazón

5 La invención se refiere a un clon de hibridoma de ratón que produce un anticuerpo monoclonal (anti-My-CcC0C2-235-3H8; IgG1, kappa), que está dirigido contra y detecta la proteína C (proteína-C, MYBPC3, cMyBPC o My-C) de unión a miosina cardíaca y no reacciona con los isómeros estrechamente relacionados de My-C de la de los músculos esqueléticos. Este mAK es adecuado como anticuerpo capturador o detector para  
10 elaborar un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para la determinación cuantitativa de My-C en suero, plasma, sangre entera u otros líquidos corporales para el diagnóstico temprano de infartos de miocardio. En el marco de este procedimiento de diagnóstico puede permitir una terapia considerablemente más temprana de los infartos de miocardio.

15 Debido al grave peligro de muerte, los infartos de miocardio deben diagnosticarse rápidamente y distinguirse de otras causas de dolor torácico. [1] La determinación de biomarcadores de necrosis miocárdica es hoy en día esencial para el diagnóstico de infartos en supuestos SNCE-ACS (síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST) y obligatoria para el diagnóstico en el contexto clínico correspondiente. La troponina cardíaca (cTn) es considerada por el momento como el biomarcador decisivo. Forman parte de la definición general de infarto. [2] No  
20 obstante, las troponinas cardíacas (cTn) presentan deficiencias y nuevos biomarcadores podrían resultar muy valiosos. [3] La concentración de cTn en el suero no alcanza el máximo hasta 16-18 horas después de aparecer los síntomas y una desventaja de los ensayos cTn utilizados hasta ahora es su falta de sensibilidad analítica para detectar las concentraciones bajas de cTn en las primeras horas después de la aparición de los síntomas. [4; 5] Los ensayos de cTn más recientes tienen por objeto determinar de manera fiable niveles bajos de cTn, pero su reducida  
25 especificidad para los infartos disminuye su valor porque hay que tener en cuenta las concentraciones de cTn cercanas al percentil 99 en los sujetos de prueba sanos. Pero incluso en ese caso, las concentraciones de cTn para hasta un 25 % de los pacientes de infarto se encuentran por debajo de ese límite. [6] Teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad limitadas de los ensayos de cTn, en las guías correspondientes (NICE) se recomienda determinar la cTn 10-12 horas después de aparecer los síntomas (dolores en la región del tórax) para asegurar el diagnóstico. [1] Aunque existe una serie de biomarcadores que se liberan más rápidamente después de un infarto, ninguno de estos ha podido establecerse porque no se expresan de forma específica para el corazón. [7] Por este motivo, los esfuerzos se centran actualmente en analizar el alcance de los cambios temporales de las concentraciones de cTn para mejorar el valor informativo de los ensayos de cTn. Sigue sin estar claro cuán grande  
30 tendría que ser la diferencia de concentración absoluta para que las diferencias en la variación analítica y biológica de las concentraciones de cTn carezcan de sentido para el diagnóstico previsto.

El biomarcador ideal tendría que ser liberado rápidamente del miocardio después de un infarto pero, a diferencia de los marcadores comparables utilizados hasta ahora, tendría que ser específico del corazón. La proteína C (proteína-C, MYBPC3, cMyBP-C o My-C) de unión a miosina cardíaca es una proteína que cumple con estos  
40 criterios. Se identificó en el análisis del proteoma del flujo de salida coronario de corazones de ratones isquémicos. [8] Es una de las proteínas de mayor expresión en el miocardio (posición 19 de 2.300 proteínas) y presenta como mínimo el doble de concentración que cTnI y cTnT (posiciones 92 y 118 de 2.300 proteínas). [9]

Existen 3 isómeros de My-C diferentes que son codificados por genes diferentes. A diferencia del My-C de los músculos esqueléticos rápidos y el My-C de los músculos esqueléticos lentos, la isoforma específica del corazón tiene un dominio N-terminal único (figura 1) y otras áreas cardíacas específicas que podrían servir como epítomos  
45 específicos. [10]

Se demostró la liberación de My-C después de infartos o daños de miocardio [8; 11; 12; 13; 14] y se comparó la evolución temporal de los aumentos de concentración con los de cTn.

La Patente WO 2008/104289 da a conocer la producción de anticuerpos específicos de MYBPC3.

Theis y otros ("Expression Patterns of Cardiac Myofibrillar Proteins", Circ Heart Fail, julio de 2009, páginas 325 - 333) dan a conocer un anticuerpo monoclonal que une el extremo N-terminal de MYBPC3.

Govindan y otros ("Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction", Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 52 (2012): 154-164) da a conocer la utilización de anticuerpos policlonales para la detección de productos de degradación N-terminales de MyBP-C.

La invención se basó en el objetivo de crear anticuerpos monoclonales producibles *in vitro* contra epítomos específicos del corazón de la My-C humana mediante generación de clones de células de mieloma que producen dichos anticuerpos específicos con especificidad de epítomo.

Estos anticuerpos monoclonales deberían permitir, entre otros, elaborar un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para la determinación cuantitativa específica, sin reactividad cruzada, de My-C en suero, plasma o

sangre entera.

El objetivo se consigue mediante generación de un clon de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce y une un epítipo específico del corazón en My-C y no presenta ninguna reactividad cruzada contra las proteínas de unión a miosina de los músculos esqueléticos. La línea celular de hibridoma se obtiene mediante fusión de células de mieloma con células de bazo de un animal de laboratorio, en particular el ratón, inmunizado contra My-C recombinante. La línea celular de hibridoma fue depositada el 10 de diciembre de 2013 en la DSMZ, según los requisitos del Tratado de Budapest, con el número de entrada DSM ACC3223. El anticuerpo producido por este clon de célula de hibridoma es adecuado en combinación con uno o varios otros mAK en un ELISA para la determinación sensible de la concentración de My-C en el suero y, por tanto, para el diagnóstico temprano de infartos de miocardio.

También es objeto de la invención el anticuerpo específico de epítipo producido por la línea celular de hibridoma y su utilización.

Para generar clones de hibridoma que produzcan anticuerpos monoclonales contra la My-C humana específica del corazón, se inmunizaron ratones Balb/c de modo conocido a intervalos de seis a ocho semanas con los dominios recombinantes cC0C2 de la My-C (figura 2). A los ratones se les suministró una dosis de refuerzo antes de la extirpación del bazo. Las células del bazo aisladas se fusionan de modo conocido con células de la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC CPL 1580) y se cultivan en medios adecuados. [15] Se seleccionan los hibridomas que producen exclusivamente anticuerpos contra la My-C humana, se clonan múltiples veces y se propagan. La selección primaria de estos hibridomas específicos se realizó con ayuda de un ELISA, en el que el péptido cC0C2 de la My-C se adsorbió en la superficie de placas de microtitulación.

La especificidad del epítipo del anticuerpo monoclonal del clon seleccionado a partir de los clones conforme a estos criterios y seleccionado según la invención se determinó mediante escaneo de péptidos (Pepscan) (16, 17, 18). Para ello, se sintetizaron péptidos (de secuencia idéntica a la de los dominios cC0C2 utilizados para la inmunización de la My-C) con una longitud de 15 restos de aminoácidos como puntos individuales sobre una membrana. Las secuencias de los péptidos de 15 -meros de puntos contiguos se superpusieron, de forma que la secuencia de aminoácidos total de los dominios cC0C2 de la My-C se sintetizó en un total de 111 puntos superpuestos. Estos péptidos se incubaron sobre la membrana de mapeo con el anticuerpo monoclonal según la invención. La detección del anticuerpo unido tuvo lugar con el sistema ECL™ (Quimioluminiscencia potenciada) sobre una película. Con la ayuda de este procedimiento se pudo determinar cuáles de los péptidos de 15 -meros son reconocidos por el anticuerpo monoclonal producido según la invención. A través de la secuencia conocida de los péptidos en los puntos individuales detectados (véase figura 3) fue posible deducir la secuencia de aminoácidos del epítipo de la My-C humana reconocida mediante el anticuerpo monoclonal del clon de hibridoma. (figura 4)

El anticuerpo 3H8 monoclonal producido con el clon de hibridoma producido se une a la My-C humana en el epítipo con la secuencia -A149-P-D-D-P-I-G-L-F-V-M-

La prueba de que el anticuerpo monoclonal producido según la invención no solo detecta péptidos en esta membrana Pepsport sino también la molécula completa del dominio cC0C2 de la My-C humana que contiene este epítipo, se mostró mediante su utilización en un ELISA. Un ELISA de este tipo, a modo de ejemplo, con el anticuerpo 3H8 monoclonal se muestra en la figura 5. El anticuerpo (IgG<sub>1</sub>, kappa) monoclonal caracterizado por epítipo mencionado anteriormente se puede modificar o marcar en su forma nativa o como fragmento. Este anticuerpo o sus formas modificadas se pueden utilizar para esclarecer el proceso de la My-C humana, la cinética de su liberación y su aclaramiento del suero, para su detección cualitativa y su determinación cuantitativa (por ejemplo, ELISA e inmunotransferencia de tipo Western), en la inmunohistología o como diagnóstico.

La invención se explica a continuación en detalle mediante ejemplos de realización.

### Ejemplos de realización

Ejemplo1:

Producción de la línea celular de hibridoma

El bazo de un ratón inmunizado de modo conocido con cC0C2 de la My-C se extirpa bajo condiciones estériles, y las células del bazo se extraen de la cápsula del bazo enjuagándolas con medio RPMI1640 (Life Technologies™, Karlsruhe) utilizando una jeringa y se separan. Las células del bazo se granulan (10 minutos a 300 x g), se lavan tres veces con medio RPMI1640 y se vuelven a suspender en medio RPMI1640. Luego se fusionan con células de mieloma de la línea P3X63Ag8.653 (ATCC CPL 1580). Para ello, también se granulan y se lavan tres veces las células de mieloma cultivadas, que se encuentran en la fase logarítmica del crecimiento.  $1 \times 10^8$  células del bazo y  $5 \times 10^7$  células de mieloma se introducen mediante pipeta en un tubo de centrifugación, se mezclan y centrifugan intensivamente, y al sedimento de células se añaden gota a gota 1,5 ml de polietilenglicol 1500 (Roche, Basilea) al 50 % previamente calentados en un plazo de un minuto y girando continuamente el tubo a 37° C. La preparación de

fusión se incubaba a continuación durante otro minuto a 37° C. En los siguientes tres minutos se añade gota a gota medio previamente calentado (RPMI1640), en el primer minuto 1 ml, en el segundo minuto 3 ml y a continuación 18 ml. A continuación, se centrifuga inmediatamente a 200 x g durante 10 minutos. El gránulo de células se añade a medio RPMI1640 con HAT y FCS al 10 %. Una parte del gránulo se siembra en placas de cultivo de 96 -pocillos y el resto se congela en nitrógeno líquido a - 196° C. Para el cultivo se utilizan como células alimentadoras macrófagos peritoneales de ratón que se añadieron al cultivo 1 día antes de la fusión (1 x 10<sup>4</sup> macrófagos por pocillo en medio HAT). Las células se incuban en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37° C. El medio se sustituye respectivamente después de 3-5 días por medio HAT RPMI1640 recién preparado y, en función del crecimiento de las células fusionadas, los sobrenadantes de cultivo se prueban después de aproximadamente 2 semanas con un ELISA para comprobar su reactividad frente al antígeno (My-C).

Ejemplo 2:

Selección de los clones productores de anticuerpos

Todos los clones en crecimiento o sus anticuerpos se probaron para comprobar su reactividad con la ayuda de un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). El inmunoabsorbente era el inmunógeno, el dominio cC0C2 recombinante de la My-C (aproximadamente 2 µg/ml).

Realización del ELISA:

1. Recubrimiento de las placas de microtitulación (Costar, adhesión fuerte) con respectivamente 50 µl de solución de inmunógeno por pocillo a 4° C durante la noche;
2. Lavado de las placas de microtitulación (MTP), 3 veces con TBS (solución salina tamponada con Tris), pH 7,4;
3. Bloqueo de las MTP con 200 µl de reactivo de bloqueo (Boehringer, Mannheim) por pocillo, 1 hora a 37° C;
4. Lavado de las MTP, 3 veces con NaCl-Tween 20;
5. Incubación con sobrenadante de cultivo de los cultivos de hibridoma; respectivamente 50 µl por pocillo, diluido aproximadamente 1 : 2 con TBS-Tween 20;
6. Lavado de las MTP, 3 veces con NaCl-Tween 20;
7. Incubación con anticuerpos anti-Ig de ratón, acoplados a peroxidasa, 50 µl por pocillo, 1 hora a temperatura ambiente;
8. Lavado de las MTP, 3 veces con NaCl-Tween 20;
9. Incubación con solución ABTS (100 mg ABTS cada 100 ml de tampón de sustrato [citrato, perborato de sodio, pH 4,4]), 50 µl por pocillo;
10. Medición a 405 nm después de 60 minutos de tiempo de incubación a temperatura ambiente con un lector de microplacas (SLT).

Ejemplo 3:

Cartografía del epítipo para el anticuerpo 3H8 monoclonal en My-C humana específica del corazón

La identificación del punto de unión del anticuerpo 3H8 monoclonal tuvo lugar con el método del escaneo de péptidos. Para ello, toda la secuencia de aminoácidos del dominio cC0C2 humano de la My-C que se utilizó para la inmunización, se dividió en un total de 111 secuencias de aminoácidos superpuestas con una longitud de respectivamente 15 aminoácidos. Estas secuencias se sintetizan como péptidos individuales en puntos directamente sobre una membrana de celulosa. La membrana se incubaba con los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas, que contienen los anticuerpos, y los puntos de unión de los anticuerpos se hacen visibles mediante incubación con un anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa. Para ello, después de tres lavados con TBS-Tween, la membrana se coloca entre láminas de copiado, a continuación se incubaba durante 3 minutos con el reactivo de detección ECL™ (Quimioluminiscencia potenciada) (Amersham, Braunschweig). Una película superpuesta (Hyperfilm-ECL™ [RPN 2103H Amersham, Braunschweig]) se expone a la luz a continuación entre 30 segundos y 3 minutos. La identificación de las secuencias detectadas por el anticuerpo tiene lugar mediante asignación de los puntos 37 y 38 (figura 4) expuestos a la luz sobre la película a las secuencias parciales de 15 -meros del inmunógeno (dominio cC0C2 de la My-C) localizadas en los puntos.

Punto 37	145	PTPGAPDDPIGLFVM	15	3H8
Punto 38	149	APDDPIGLFVMRPQD	15	3H8

La secuencia central reconocida de ambas secuencias parciales es la serie de aminoácidos A149-P-D-D-P-I-G-L-F-V-M-.

Esta secuencia es el epítipo detectado al que se une el anticuerpo 3H8 en la My-C humana.

**Lista de referencias**

1. Cooper A, Timmis A, Skinner J. Assessment of recent onset chest pain or discomfort of suspected cardiac origin: Summary of nice guidance. *BMJ*. 2010;340:c1118
- 5 2. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Katus HA, Lindahl B, Morrow DA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasche P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghide M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012;126:2020-2035
- 10 3. Gerszten RE, Carr SA, Sabatine M. Integration of proteomic-based tools for improved biomarkers of myocardial injury. *Clin.Chem*. 2010;56:194-201
- 15 4. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, Noe A, Matern G, Kuebler W. Diagnostic efficiency of troponin t measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1991;83:902-912
5. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AH, Christenson RH. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2007;115:e356-375
- 20 6. Hoeller R, Rubini Gimenez M, Reichlin T, Twerenbold R, Zellweger C, Moehring B, Wildi K, Freese M, Stelzig C, Hartmann B, Stoll M, Mosimann T, Reiter M, Haaf P, Mueller M, Meller B, Hochgruber T, Balmelli C, Sou SM, Murray K, Freidank H, Steuer S, Minners J, Osswald S, Mueller C. Normal presenting levels of high-sensitivity troponin and myocardial infarction. *Heart*. 2013
7. Baker JO, Reinhold J, Redwood S, Marber MS. Troponins: Redefining their limits. *Heart*. 2011;97:447-452
- 25 8. Jacquet S, Yin X, Sicard P, Clark J, Kanaganayagam GS, Mayr M, Marber MS. Identification of cardiac myosin-binding protein c as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:2687-2699
9. Aye TT, Scholten A, Taouatas N, Varro A, Van Veen TA, Vos MA, Heck AJ. Proteome-wide protein concentrations in the human heart. *Mol Biosyst*. 2010;6:1917-1927
- 30 10. Sadayappan S, de Tombe PP. Cardiac myosin binding protein-c: Redefining its structure and function. *Biophys Rev*. 2012;4:93-106
11. Baker JO, Devaraj R, Reinhold J, Kanaganayagam G, Sadayappan S, Gautel M, Redwood S, Marber M. Cardiac myosin-binding protein c as a potential new serum biomarker of myocardial infarction. *Circulation*. 2010;122:A15438
- 35 12. Govindan S, Kuster DW, Lin B, Kahn DJ, Jeske WP, Walenga JM, Laya F, Hoppensteadt D, Fareed J, Sadayappan S. Increase in cardiac myosin binding protein-c plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction. *Am J Cardiovasc Dis*. 2013;3:60-70
13. Govindan S, McElligott A, Muthusamy S, Nair N, Barefield D, Martin JL, Gongora E, Greis KD, Luther PK, Winegrad S, Henderson KK, Sadayappan S. Cardiac myosin binding protein-c is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:154-164
- 40 14. Liebetrau C, Mollmann H, Nef H, Szardien S, Rixe J, Troidl C, Willmer M, Hoffmann J, Weber M, Rolf A, Hamm C. Release kinetics of cardiac biomarkers in patients undergoing trans-catheter aortic valve replacement. *Clin Chem*. 2012;58:1049-1054
15. Köhler, G., Milstein, C., *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497;
16. Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K., *J. Immunol.*, 1979, 123(4): 1548 - 50;
17. Galfre, G., Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 1981, 73(Pt B): 3-46
- 45 18. Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J., Tribbick, G., Schoofs, P.G., *J. Immunol. Methods*, 1987, 102(2): 259-274

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Línea celular de hibridoma DSM ACC3223 que produce el anticuerpo (anti-My-C-3H8) monoclonal contra la proteína C de unión a miosina cardíaca humana.
2. Anticuerpo monoclonal anti-My-C-3H8, **caracterizado por que** este es producido por una línea celular de hibridoma, según la reivindicación 1.
- 10 3. Procedimiento para producir anticuerpos monoclonales murinos, según la reivindicación 2, **caracterizado por que** se cultiva una línea celular de hibridoma, según la reivindicación 1, y se aíslan los anticuerpos monoclonales producidos.
- 15 4. Utilización *in vitro* del anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 2, para fines analíticos, en particular como anticuerpo capturador o detector en un ELISA para determinar la concentración de My-C en el suero o en el plasma y, por tanto, para el diagnóstico temprano de infartos de miocardio o en inmunotransferencias, la inmunohistoquímica y otros procedimientos analíticos.

Figura 1:

Estructura primaria de My-C cardíaca en la región del epítipo (marcado) detectado por el anticuerpo monoclonal anti-My-C-cC0C2-235-3H8 en comparación con las estructuras primarias de MyC de la musculatura esquelética y plana (MYC1\_HUMAN y MYC2\_HUMAN)

121

PAPAAELGESAPSPKGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMRPQDGEVTVGGSITFSARVAG

180 Q14896 MYC3\_HUMAN

40 \_\_\_\_\_PEDQS\_\_\_\_\_PT\_\_\_AEEPTGVFLKKPDSVSVETGKDAVVVAKVNG

77 Q14324 MYC2\_HUMAN

43 \_\_\_\_\_PGEEQ\_\_\_\_\_AKQNANSQLSILFIEKPGGGTVKVGEDITFIAKVKA

83 Q00872 MYC1\_HUMAN

**Figura 2:**  
**Secuencia de aminoácidos de los dominios cC0C2 de My-C cardíaca**  
**(Proteína C de unión a miosina)**

1	MPEPGKKPVS	AFSKKPRSVE	VAAGSPAVFE	AETERAGVKV
61	GTRHTLTVRE	VGPADQGSYA	VIAGSSKVKF	DLKVIEAEKA
121	PAPAAELGES	APSPKGSSSA	ALNGPTPGAP	DDPIGLFVMR
181	ASLLKPPVVK	WFKGKWVDLS	SKVGQHLQLH	DSYDRASKVY
241	VSTKDKFECS	NFNLTVHEAM	GTGDLDLLSA	FRRTSLAGGG
301	KRDSFRTPRD	SKLEAPAEED	VWEILRQAPP	SEYERIAFQY
361	KSTAFQKKLE	PAYQVSKGHK	IRLTVELADH	DAEVKWLKNG
421	LTISQCCLAD	DAAYQCVVGG	EKCSTELFVK	E

**Figura 3:**  
**Mapeo de epítipo de anti-My-C-cC0C2-235-3H8**  
**Película ECL: Detección del mAK 3H8 unido a los puntos 37 y 38 de la**  
**membrana Pepsport-My-C-cC0C2.**

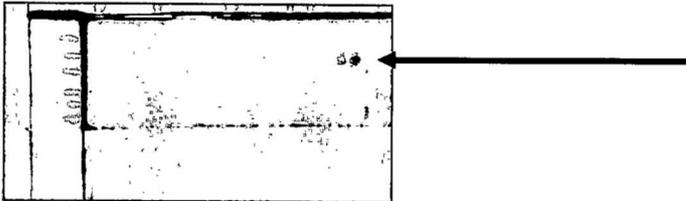


Figura 4: Mapeo de epítipo: Lista de los péptidos de 15 meros superpuestos y contenidos en los Pepsots 1-41 de la membrana de mapeo

Punto	Inicio AA	Secuencia de péptido	Longitud de péptido
1	1	MPEPGKKPVSAFSKK	15
2	5	GKKPVSAFSKKPRSV	15
3	9	VSAFSKKPRSV E VAA	15
4	13	SKKPRSV E VAA GSPA	15
5	17	RSVEVAAGSPAVFEA	15
6	21	VAAGSPAVFEAETER	15
7	25	SPAVFEAETERAGVK	15
8	29	FEAETERAGVKVRWQ	15
9	33	TERAGVKVRWQRGGS	15
10	37	GVKVRWQRGGS DISA	15
11	41	RWQRGGS DISAS NKY	15
12	45	GGSDISAS NKY GLAT	15
13	49	ISAS NKY GLATE GTR	15
14	53	NKY GLATE GTR HTLT	15
15	57	LATE GTR HTLT VREV	15
16	61	GTR HTLT VREV GPAD	15
17	65	TLTVREV GPAD QGSY	15
18	69	REVG PAD QGSY AVIA	15
19	73	PAD QGSY AVIAG SSK	15
20	77	GSY AVIAG SSK VKFD	15
21	81	VIAG SSK VKFD LKVI	15
22	85	SSK VKFD LKVI EAEK	15
23	89	KFD LKVI EAEK AEP M	15
24	93	KVIEAEK AEP MLAPA	15
25	97	AEK AEP MLAPA PAPA	15
26	101	EPMLAPA PAPA EATG	15
27	105	APAPA PAPA EATG APGE	15
28	109	APAEATG APGE APAP	15
29	113	ATG APGE APAPA AEL	15
30	117	PGE APAPA AEL GESA	15
31	121	PAPAAEL GES APSPK	15
32	125	AEL GES APSPK GSSS	15
33	129	ESAPSPK GSSS AALN	15
34	133	SPKGSSS AALN GPTP	15
35	137	SSS AALN GPTP GAPD	15
36	141	ALN GPTP GAPD DPIG	15
37	145	PTP GAPD DPIG L FVM	15 3H8
38	149	APDDPIG L FVM RPQD	15 3H8
39	153	PIG L FVM RPQD GEVT	15
40	157	FVM RPQD GEVT VGGS	15
41	161	PQD GEVT VGGS ITFS	15

**Figura 5:**  
Detección de la unión para el anticuerpo monoclonal cC0C2-235-3H8 a cC0C2 recombinante mediante ELISA.

**Realización del ELISA**

**Detección de cC0C2:**

- a: **Antígeno adsorbido:** 50  $\mu$ l de cC0C2 (2  $\mu$ g/ml) por pocillo  
+ cC0C2-235-3H8 (purificado, 0,4 mg/ml)  
+ anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, POD marcado, 1:5000  
+ ABTS

**Controles:**

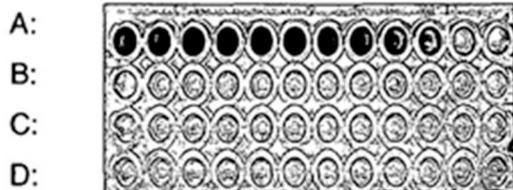
- b: **Antígeno adsorbido:** 50  $\mu$ l de cC0C2 (2  $\mu$ g/ml) por pocillo  
+ anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, POD marcado, 1:5000  
+ ABTS

**Medición:**

Absorción a 405 nm

Serie A + B (a): Dilución del AK purificado (0,4 mg/ml) 1:10  $\rightarrow$  1 : 160000

Serie C + D (b): Controles



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- WO 2008104289 A

**Literatura no patente citada en la descripción**

- THEIS et al. Expression Patterns of Cardiac Myofilament Proteins. *Circ Heart Fail*, Juli 2009, 325-333
- GOVINDAN et al. Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, vol. 52, 154-164
- COOPER A ; TIMMIS A ; SKINNER J. Assessment of recent onset chest pain or discomfort of suspected cardiac origin: Summary of nice guidance. *BMJ*, 2010, vol. 340, c1118
- THYGESEN K ; ALPERT JS ; JAFFE AS ; SIMOONS ML ; CHAITMAN BR ; WHITEHD ; KATUS HA ; LINDAHL B ; MORROW DA ; CLEMMENSEN PM. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 2012, vol. 126, 2020-2035
- GERSZTEN RE ; CARR SA ; SABATINE M. Integration of proteomic-based tools for improved biomarkers of myocardial injury. *Clin.Chem.*, 2010, vol. 56, 194-201
- KATUS HA ; REMPPIS A ; NEUMANN FJ ; SCHEFFOLD T ; DIEDERICH KW ; VINAR G ; NOE A ; MATERN G ; KUEBLER W. Diagnostic efficiency of troponin t measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1991, vol. 83, 902-912
- MORROW DA ; CANNON CP ; JESSERL ; NEWBY LK ; RAVKILDE J ; STORROW AB ; WU AH ; CHRISTENSON RH. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*, 2007, vol. 115, e356-375
- HOELLER R ; RUBINI GIMENEZ M ; REICHLIN T ; TWERENBOLD R ; ZELLWEGER C ; MOEHRING B ; WILDI K ; FREESE M ; STELZIG C ; HARTMANN B. Normal presenting levels of high-sensitivity troponin and myocardial infarction. *Heart*, 2013
- BAKER JO ; REINHOLD J ; REDWOOD S ; MARBER MS. Troponins: Redefining their limits. *Heart*, 2011, vol. 97, 447-452
- JACQUET S ; YIN X ; SICARD P ; CLARK J ; KANAGANAYAGAM GS ; MAYR M ; MARBER MS. Identification of cardiac myosin-binding protein c as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2009, vol. 8, 2687-2699
- AYE TT ; SCHOLTEN A ; TAOUATAS N ; VARRO A ; VAN VEEN TA ; VOS MA ; HECK AJ. Proteome-wide protein concentrations in the human heart. *Mol Biosyst.*, 2010, vol. 6, 1917-1927
- SADAYAPPAN S ; DE TOMBE PP. Cardiac myosin binding protein-c: Redefining its structure and function. *Biophys Rev.*, 2012, vol. 4, 93-106
- BAKER JO ; DEVARAJ R ; REINHOLD J ; KANAGANAYAGAM G ; SADAYAPPAN S ; GAUTEL M ; REDWOOD S ; MARBER M. Cardiac myosin-binding protein c as a potential new serum biomarker of myocardial infarction. *Circulation*, 2010, vol. 122, A15438
- GOVINDAN S ; KUSTER DW ; LIN B ; KAHN DJ ; JESKE WP ; WALENGA JM ; LEYA F ; HOPPENSTEADT D ; FAREED J ; SADAYAPPAN S. Increase in cardiac myosin binding protein-c plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction. *Am J Cardiovasc Dis.*, 2013, vol. 3, 60-70
- GOVINDAN S ; MCELLIGOTT A ; MUTHUSAMY S ; NAIR N ; BAREFIELD D ; MARTIN JL ; GONGORA E ; GREIS KD ; LUTHER PK ; WINEGRAD S. Cardiac myosin binding protein-c is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.*, 2012, vol. 52, 154-164
- LIEBETRAU C ; MOLLMANN H ; NEF H ; SZARDIEN S ; RIXE J ; TROIDL C ; WILLMER M ; HOFFMANN J ; WEBER M ; ROLF A. Release kinetics of cardiac biomarkers in patients undergoing trans-catheter ablation of septal hypertrophy. *Clin Chem.*, 2012, vol. 58, 1049-1054
- KÖHLER, G. ; MILSTEIN, C. *Nature*, 1975, vol. 256 (5517), 495-497
- KEARNEY, J.F. ; RADBRUCH, A. ; LIESEGANG, B. ; RAJEWSKY, K. *J. Immunol.*, 1979, vol. 123 (4), 1548-50

- **GALFRE, G. ; MILSTEIN, C.** *Methods Enzymol.*, 1981, vol. 73, 3-46
- **GEYSEN, H.M. ; RODDA, S.J. ; MASON, T.J. ; TRIBBICK, G. ; SCHOOF, P.G.** *J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 102 (2), 259-274