

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 282**

51 Int. Cl.:
C07K 16/26 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04732278 .9**
96 Fecha de presentación: **12.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1625163**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **MÉTODO PARA DETECTAR PROBPNP CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL QUE FIJA LOS AMINOÁCIDOS 38-43.**

30 Prioridad:
12.05.2003 EP 03010591

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.01.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
KLEMT, Volker;
BORGIA, Anneliese;
GALLUSSER, Andreas;
GROL, Michael;
HALLERMAYER, Klaus y
SEIDEL, Christoph

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 372 282 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

Método para detectar proBNP con un anticuerpo monoclonal que fija los aminoácidos 38-43

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a una subpoblación de proBNP total llamada proBNP nativo, a un método para la detección específica de proBNP nativo, a un método para relacionar el nivel de proBNP nativo con el diagnóstico de fallo cardíaco, a un kit para la detección de proBNP nativo y a una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo del proBNP nativo.

10 El fallo cardíaco es un fenómeno generalizado, sobre todo en el mundo occidental. Según el diccionario médico Roche (Urban & Schwarzenberg, 1993) el fallo cardíaco es la incapacidad aguda o crónica del corazón para generar el flujo sanguíneo requerido por el metabolismo durante el ejercicio, o incluso en reposo, o para asegurar el reflujo venoso (insuficiencia cardíaca retrógrada y anterógrada). Por tanto la función de bombeo del corazón es débil. Las causas de fallo cardíaco son muy complejas. Entre otras cabe mencionar alteraciones inflamatorias y degenerativas
15 del músculo cardíaco, trastorno de la perfusión coronaria, infarto y lesiones coronarias, que provocan modificaciones del riego sanguíneo periférico, trastornos del sistema respiratorio, de la función renal y del metabolismo electrolítico (edema) y menor rendimiento del sistema muscular del esqueleto.

20 Conforme a la Asociación cardíaca de Nueva York (New York Heart Association (NYHA)) la insuficiencia cardíaca se divide en las siguientes clases NYHA, mediante pruebas físicas posteriores al esfuerzo: I significa ausencia total de dolor después del esfuerzo físico normal, II significa pequeña limitación de la resistencia física, III significa fuerte limitación de la resistencia física, IV significa que los síntomas de insuficiencia aumentan con cada actividad física y también existen en reposo la mayor parte del tiempo.

25 Para tratar eficazmente la insuficiencia cardíaca con medicamentos del tipo de los glicósidos, vasodilatadores, inhibidores ACE y/o bloqueadores- β , primero hay que identificarla y diagnosticarla de manera exacta y correcta, clasificándola, si es posible, según el nivel de gravedad, y además controlar el curso del tratamiento.

30 En el estado técnico se habla de algunos marcadores séricos como posibles indicadores de un diagnóstico precoz de insuficiencia cardíaca, como por ejemplo ANP (hormona peptídica natriurética atrial) y proANP, CNP (péptido natriurético C), adrenomedulina, neuropéptido Y, endotelina y BNP (péptido natriurético cerebral). Teóricamente el ANP y el proANP serían marcadores adecuados para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca; sin embargo en la práctica no son muy estables o su vida media en la sangre es corta, lo cual supone una gran desventaja para las mediciones diagnósticas rutinarias (Buckley, M.G., y otros, Clin. Sci. 95 (1998) 235-239; Cleland, J.G., y otros, Heart
35 75 (1996) 410-413).

40 Un marcador frecuentemente citado y valioso es el BNP (péptido natriurético cerebral). Al principio el BNP se detectó en el cerebro de los cerdos. Es una hormona cardíaca parecida estructural y funcionalmente al ANP (péptido natriurético atrial) (Sudoh, T., y otros, Nature 332 (1988) 78-81). El BNP humano consta de 32 aminoácidos, es secretado principalmente por los ventrículos del corazón y circula por el plasma sanguíneo humano. El uso del BNP como marcador diagnóstico es conocido por ejemplo a través de la patente EP-A-0 542 255. El BNP tiene un puente disulfuro intramolecular y no es un analito muy estable. Ello es debido probablemente a su función fisiológica como hormona que debe descomponerse con rapidez. Por tanto su empleo como marcador diagnóstico requiere cuidado y especial atención al recoger y procesar las muestras (Masuta, C., y otros, Clin. Chem. 44 (1998) 130; Tsuji, T., y
45 otros, Clin. Chem. 40 (1994) 672-673).

50 La molécula precursora del BNP, es decir el proBNP, consta de 108 aminoácidos y se divide en los 32 aminoácidos C-terminales antes citados (77-108), llamados BNP, y en los aminoácidos 1-76 N-terminales, llamados proBNP (o NT-proBNP). El BNP, el proBNP N-terminal (1-76) y otros productos de descomposición (Hunt, P.J., y otros, Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183) circulan en la sangre. No está totalmente aclarado si la molécula precursora completa (proBNP 1-108) también se encuentra en el plasma. No obstante se ha descrito (Hunt, P.J., y otros, Peptides, vol. 18, nº 10 (1997), 1475-1481) que en el plasma se puede detectar una pequeña liberación de proBNP (1-108), aunque faltan algunos aminoácidos, debido a la descomposición parcial muy rápida en el extremo N-terminal.

55 Como es sabido del estado técnico, el proBNP N-terminal (1-76) se considera un marcador de insuficiencia cardíaca.

60 La patente WO 93/24531 (US 5,786,163) describe un método inmunológico para identificar el proBNP N-terminal y los anticuerpos empleados para ello. En la patente WO 93/24531 se producen anticuerpos policlonales contra un único péptido derivado del proBNP N-terminal. Se demuestra que los anticuerpos producidos se unen al péptido de inmunización (aminoácidos 47-64) en el formato de ensayo competitivo.

65 En el ensayo competitivo realizado en la patente WO 93/24531 el péptido 47-64 marcado compite como trazador con proBNP en una muestra o con el péptido 47-64 estándar sin marcar, para unirse a anticuerpos policlonales de suero de conejo. Después de 48 horas solo se alcanza una competición moderada, dando como resultado un límite inferior de detección de 250 fmol/ml, aproximadamente. Los largos tiempos de incubación de este ensayo competitivo no

son aceptables para mediciones rutinarias de muestras en laboratorios automatizados.

Hunt, P.J., y otros, *Clinical Endocrinology* 47 (1997) 287-296, también describen un ensayo competitivo para detectar proBNP N-terminal. Este ensayo requiere una compleja extracción de la muestra de plasma antes de poder hacer las mediciones, lo cual puede provocar la destrucción del analito y mediciones erróneas. El antisuero empleado se produce análogamente a la patente WO 93/24531 por inmunización con un péptido sintético. Hunt y otros producen el antisuero por inmunización con los aminoácidos 1-13 del proBNP N-terminal, usando como patrón un péptido con los aminoácidos 1-21. Para este ensayo también se necesitan tiempos de incubación largos. Tras 24 de incubación se alcanza un límite inferior de detección de 1,3 fmol/ml.

Ng, L., y otros, WO 00/35951, describen otro método para diagnosticar proBNP N-terminal. Este método se basa en el uso de anticuerpos concebidos contra un péptido sintético que corresponde a los aminoácidos 65 hasta 76 del proBNP humano.

Hughes, D., y otros, *Clin. Sci.* 96 (1999) 373-380, informan de dos diferentes ensayos para el proBNP N-terminal. En un primer ensayo se usa un anticuerpo policlonal generado por un inmunógeno que comprende un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 65-76 del proBNP, mientras que en un segundo ensayo el anticuerpo policlonal se genera de modo análogo, pero a los aminoácidos 37-49. Según los datos producidos por Hughes, D., y otros, un anticuerpo generado y reactivo con el péptido correspondiente a los aminoácidos 37-49 del proBNP no reacciona con proBNP endógeno intacto. Un ensayo basado en este último no discrimina entre pacientes con disfunción ventricular izquierda y controles normales. Con el ensayo basado en proBNP 65-76 se pudo discriminar claramente el mismo grupo de pacientes.

Goetze, J.P. y otros, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1035-1042, describen un ensayo para los aminoácidos más N-terminales (1-21) del proBNP N-terminal. Su ensayo se basa en un anticuerpo policlonal concebido contra un péptido sintético correspondiente a los mismos aminoácidos (1-21) del proBNP.

El ensayo antedicho de Goetze, J.P. y otros requiere la digestión completa de la muestra y los distintos proBNPs que comprende. Se dice que este ensayo también fue eficiente para reducir la fijación inespecífica.

Karl, J. y otros, WO 00/45176, demostraron por primera vez que la detección sensible y rápida de proBNP N-terminal también es posible en un inmunoensayo sándwich. Tal como está descrito en la patente WO 00/45176 los epítomos preferidos se hallan entre los aminoácidos 10 y 50 del proBNP N-terminal.

La patente US 2003/0219734 se refiere al hecho de que en una muestra pueden estar presentes varios polipéptidos distintos, derivados del proBNP (1-108), del BNP (77-108), así como del proBNP N-terminal (1-76).

Mair, J., y otros, *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (2001) 571-588, han resumido el impacto de la determinación de péptidos natriuréticos cardíacos en el diagnóstico y control del fallo cardíaco. Resaltan que los ensayos comerciales actualmente disponibles no están normalizados, es decir, que no han sido calibrados contra patrones comunes. Algunos ensayos requieren incluso una extracción de plasma. Por tanto los resultados obtenidos con ensayos de diferentes fabricantes pueden diferir notablemente. Así pues, los intervalos de referencia y los límites de decisión derivados de los estudios clínicos solo son válidos para el ensayo usado en particular y no deben extrapolarse a otros ensayos de proBNP N-terminal.

En la misma línea Goetze, J.P., y otros, arriba citado, y Mair, J., *Clin. Chem.* 48 (2002) 977-978, señalan que las discrepancias entre los distintos ensayos de proBNP N-terminal, tanto respecto a los valores obtenidos como a sus implicaciones clínicas, suponen un problema crucial para el uso generalizado de este posible marcador.

Obviamente hay una gran necesidad de proporcionar un ensayo perfeccionado, p.ej. más reproducible, mejor normalizado, mejor definido y/o más relevante clínicamente para el proBNP N-terminal.

La presente invención tenía por objeto desarrollar un ensayo más específico para la medición de proBNP N-terminal y/o de un fragmento o subpoblación clínicamente relevante del proBNP N-terminal.

Tal como se describe a continuación y se reclama en las reivindicaciones adjuntas la presente invención resuelve, al menos parcialmente, uno o más de los problemas conocidos en el estado técnico.

Sorprendentemente se ha visto que es posible detectar específicamente una subpoblación de todas las especies de proBNP (proBNP total) presentes en la circulación. Esta subpoblación se denomina proBNP N-terminal nativo o simplemente "proBNP nativo". Sorprendentemente parece que la subpoblación de proBNP nativo tiene mayor importancia clínica que el proBNP total.

En una primera forma de ejecución la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une específicamente a proBNP nativo.

La presente invención también se refiere a un método para detectar específicamente proBNP nativo, que incluye las etapas de poner en contacto una muestra que contenga supuesta o ciertamente proBNP con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a proBNP nativo, en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo de proBNP nativo-proBNP nativo, y detectar el complejo formado.

5 Además la presente invención revela un método para diagnosticar insuficiencia cardíaca, que consiste en detectar proBNP nativo y relacionar el nivel de proBNP nativo con la insuficiencia cardíaca. Esta correlación del valor de proBNP nativo indica la ausencia, la presencia o el estado de insuficiencia cardíaca.

10 La presente invención también se refiere a un kit para medir proBNP nativo, el cual comprende un anticuerpo que se une específicamente a proBNP nativo y reactivos auxiliares para detectarlo. Asimismo se reivindican anticuerpos monoclonales generados por las líneas celulares de hibridoma MAB 10.4.63 y MAB 16.1.39, respectivamente, productora de un anticuerpo monoclonal específico de proBNP nativo, los cuales se ha depositado en el DSMZ (banco alemán de microorganismos y cultivos celulares).

15 En el curso de nuestros experimentos dirigidos a la presente invención se ha encontrado y establecido que en la sangre humana existen al menos dos poblaciones de proBNP. Hay una población de proBNP que al parecer representa la mayor parte de todas las moléculas de proBNP detectables por métodos inmunológicos. Esta población se denomina proBNP "total". Nuestros estudios han demostrado que las moléculas de proBNP cifrables como proBNP total poseen claramente una estructura nuclear central en común, comprendida aproximadamente entre las posiciones de los aminoácidos 10 y 66 del proBNP. El proBNP total detectado por un método según la presente invención comprende preferiblemente los aminoácidos 10 hasta 66. Como apreciará el especialista, este proBNP total puede detectarse fácilmente por procedimientos inmunológicos, bien en el formato de ensayo competitivo o en un formato de ensayo sándwich. Para detectar proBNP total se usa preferentemente un formato de ensayo sándwich. Dicho ensayo sándwich puede diseñarse para incluir anticuerpos que se unan por el extremo C- y N-terminal al epítipo del proBNP nativo respectivamente. No obstante también es posible, p.ej., detectar proBNP total mediante anticuerpos capaces formar sándwich y reaccionar con epítopos en posición N-terminal respecto al epítipo del proBNP nativo. Evidentemente en esta determinación competitiva o sándwich de proBNP total no debe usarse un anticuerpo de proBNP nativo.

30 El término "proBNP nativo" se refiere a cualquier molécula de proBNP en la que existe el epítipo reconocido por MAB 10.4.63. Según los hallazgos demostrados más adelante este epítipo solo está presente en una subpoblación de todas las moléculas de proBNP (es decir, en una subpoblación de proBNP "total"). Encontramos y pudimos establecer que esta subpoblación de proBNP total denominada "proBNP nativo" es detectable por componentes específicos de un par de fijación, preferentemente por anticuerpos policlonales y/o monoclonales.

40 La subpoblación denominada proBNP nativo no tiene por qué ser un fragmento polipéptido uniforme. La longitud del polipéptido o polipéptidos del proBNP nativo puede variar. Se espera que la mayor parte de moléculas reconocidas en un inmunoensayo sándwich de proBNP nativo representen proBNP N-terminal (1-76) o fragmentos del mismo. Un ensayo de proBNP nativo se monta preferiblemente de manera que sirva para medir fragmentos de NT-proBNP que incluyen los aminoácidos 10 hasta 66. La propiedad característica del proBNP nativo es la presencia de un epítipo de proBNP nativo reconocido por MAB 10.4.63.

45 En una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a proBNP nativo. En cuanto a los valores de proBNP determinados en las muestras de pacientes, este anticuerpo de unión específica a proBNP nativo se correlaciona con MAB 10.4.63, con valores r de al menos 0,95 o superiores.

50 Basándose en los hallazgos, en la revelación y en los depósitos de la presente invención el experto en la materia no tendrá ningún problema en valorar si un anticuerpo se une específicamente a proBNP nativo o a proBNP total. El MAB 10.4.63 se considera un ejemplo prototípico de anticuerpo que se une específicamente a proBNP nativo, mientras que el MAB 18.4.34 se considera un ejemplo prototípico de anticuerpo de proBNP total. Ahora para cualquier agente de fijación a proBNP puede evaluarse si se une específicamente a proBNP nativo o total, respectivamente.

55 Un anticuerpo que se "une específicamente" a proBNP nativo es aquel que, según los valores de proBNP determinados en muestras de pacientes, se correlaciona con MAB 10.4.63, con valores r de al menos 0,95 o superiores. La especificidad de la unión al proBNP nativo se valora en relación con las propiedades de fijación del MAB 10.4.63, usando muestras clínicas relevantes. Se emplean como mínimo 20 y como máximo 25 muestras de suero obtenidas de pacientes con un nivel de NT-proBNP de 10 ng/ml a 150 ng/ml de proBNP nativo. La unión a proBNP se determina con el sistema Biacore® 3000. Los valores obtenidos se correlacionan con los valores de proBNP nativo medidos al emplear MAB 10.4.63 y la evaluación estadística se realiza por análisis de regresión lineal. Una regresión lineal del tipo $y = ax + b$ se ajusta preferiblemente con el programa MS-Excel, calculando el coeficiente de correlación r y la pendiente. Con mayor preferencia dicho anticuerpo detectará esencialmente la misma subpoblación de proBNP nativo del proBNP total fijada por el MAB 10.4.63, con lo cual una unión a prácticamente la misma subpoblación da como resultado una correlación de $r = 0,98$ o mayor, según los procedimientos anteriores.

El MAB 18.4.34 se puede considerar un anticuerpo prototípico para medir proBNP total. Para cualquier anticuerpo que se una específicamente a proBNP nativo (empleando las mismas muestras y procedimientos arriba descritos) la correlación con MAB 18.4.34, es decir con proBNP total, será normalmente inferior a la correlación con MAB 10.4.63. Para un anticuerpo que se una específicamente a la subpoblación de proBNP nativo del proBNP la correlación con MAB 18.4.34 será de $r = 0,94$ o menor. Con mayor preferencia será inferior a 0,9 o tan baja como $r = 0,8$ o menor.

Al cotejar las cantidades absolutas medidas con estos métodos comparados, los ensayos de detección de proBNP dieron consistentemente valores de proBNP 2 hasta 20 veces, en la mayoría de los casos 2 hasta 5 veces mayores, aproximadamente, en comparación con el MAB 10.4.63. Además de la correlación arriba mencionada, un anticuerpo preferido que se una específicamente a proBNP nativo también presentará una pendiente menor de 1,5 en dicha comparación de métodos. Con mayor preferencia la pendiente estará comprendida entre 0,4 y 1,5.

La unión específica tiene lugar preferiblemente con una afinidad de al menos 10^7 l/mol. El agente de unión específica más preferido tiene una afinidad de 10^8 l/mol o, con mayor preferencia de 10^9 l/mol, por el proBNP nativo.

Como se ha explicado arriba una característica muy importante y preferida del MAB 10.4.63 es que este anticuerpo fija solo una fracción variable, entre un 5% y un 50%, de proBNP total, como la contenida en una muestra clínica típica.

Un ejemplo prototípico de anticuerpo que se une específicamente a proBNP nativo es el anticuerpo monoclonal producido por el clon MAB 10.4.63, que ha sido depositado en el DSMZ. El MAB 10.4.63 se fija esencialmente al mismo epítipo que el MAB 16.1.39. Sin embargo, como el MAB 10.4.63 tiene mayor afinidad por el proBNP nativo, este anticuerpo se ha elegido como el prototipo de anticuerpo (monoclonal) que se une específicamente a proBNP nativo.

El MAB 10.4.63 ha sido producido del modo descrito en la sección de ejemplos. El epítipo de proBNP reconocido por este y otros anticuerpos ha sido identificado, caracterizado y mapeado mediante el uso de péptidos sintéticos cortos que corresponden a secuencias de proBNP bien definidas. Este método es conocido y se denomina análisis PepScan.

Resumiendo, se han preparado 69 péptidos sintéticos que comprenden 8 aminoácidos consecutivos de proBNP, con una cisteína N-terminal, un espaciador molecular y biotina. Cada uno de estos péptidos resultó de correr un aminoácido desde el extremo N hacia el extremo C. Así el péptido 1 comprende los aminoácidos (aas) 1 a 8, el péptido 2 los aas 2 a 9, etc., y el péptido 69 los aas 69 a 76.

Se ha visto que el MAB 10.4.63 reacciona considerablemente con los péptidos 35 (aminoácidos 35-42) hasta 38 (aas 38-45), que tienen en común los aminoácidos en posición 38 hasta 42. La reactividad es más fuerte con el péptido 37, que abarca los aas 37 hasta 44 del proBNP. Por lo tanto puede concluirse que el MAB 10.4.63 reacciona con un epítipo formado básicamente por los aminoácidos 38 hasta 43 o 44 del proBNP.

Que el especialista aprecie la presencia o ausencia de un epítipo dependerá de la estructura terciaria, de las modificaciones secundarias, de la formación de complejos, etc. Obviamente el MAB 10.4.63 y otros anticuerpos del proBNP nativo tienen requerimientos muy específicos al respecto y no reaccionan con la mayoría de moléculas de proBNP presentes en una muestra típica. Como es improbable que los péptidos sintéticos cortos caracterizados por PepScan tengan una estructura terciaria o modificaciones secundarias, el epítipo reconocido por MAB 10.4.63 debería estar inalterado; por tanto el término "nativo" se ha considerado apropiado.

Un ensayo basado en un anticuerpo de proBNP nativo y un ensayo que mida proBNP total presentan fuertes diferencias en la intensidad de reacción una vez efectuadas y comparadas las mediciones de proBNP sintético (1-76) y de proBNP contenido en una muestra clínica como suero humano. El uso de proBNP sintético (1-76) permite establecer y normalizar fácilmente procedimientos de detección. Mediante este ensayo las mediciones de proBNP sintético (1-76), ya sea en una matriz sintética o añadido a una muestra natural como suero humano, dan los mismos niveles en ambos ensayos. Sin embargo, sorprendentemente, se encuentran fuertes diferencias cuando el proBNP contenido en una muestra natural, como suero humano, se mide en ambos ensayos.

Un ensayo en el cual se emplea un anticuerpo (o anticuerpos, respectivamente) que reacciona con proBNP total, como los anticuerpos monoclonales MAB 17.3.1, 18.4.34 o 18.29.23, respectivamente, parece detectar todas las moléculas de proBNP presentes en una muestra de suero, es decir proBNP total. En cambio un ensayo basado en un anticuerpo que reacciona con proBNP nativo, p.ej. MAB 10.4.63, solo detecta una fracción de este proBNP total.

Mediante la presente invención puede demostrarse que la subpoblación de proBNP nativo del proBNP total muestra clínicamente una correlación muy buena con el BNP biológicamente activo. Al medir BNP se han observado evidentemente todas las precauciones necesarias durante el muestreo y la manipulación, a fin de obtener valores de BNP correctos. Para la medición de proBNP nativo resultó satisfactorio el proceso rutinario de muestreo, sin necesidad de precauciones específicas.

Todos los datos establecidos con la presente invención indican claramente que el epítipo identificado en la presente invención y fijado específicamente por MAB 10.4.63 es muy importante para anticuerpos de proBNP nativo apropiados. Desde luego este epítipo de proBNP nativo reconocido por MAB 10.4.63 puede sufrir una modificación natural o pasar a formar parte de un complejo proteico, de modo que el cambio producido en este epítipo hace que el MAB 10.4.63 no se una en absoluto, o solo en menor grado, a este proBNP modificado o complejado. El proBNP que lleva este epítipo de proBNP modificado "no nativo" solo se mide significativamente en ensayos de proBNP total.

Por su gran reproducibilidad intrínseca los anticuerpos monoclonales son herramientas preferidas para detectar proBNP nativo. En una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere, por lo tanto, a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a proBNP nativo.

Como apreciará el especialista se pueden encontrar otros anticuerpos monoclonales que en comparación con el MAB 10.4.63 muestren un modelo de reactividad ligeramente distinto con los péptidos PepScan números 35 a 38. Un anticuerpo monoclonal de proBNP nativo no se apartará del espíritu de la presente invención, mientras solo sea detectada una subpoblación de proBNP total correlacionada con un valor r de al menos 0,95 o superior con la subpoblación de proBNP nativo comprendida en la población de proBNP total y fijada por MAB 10.4.63. Dicha correlación se determina empleando el sistema Biacore® y la evaluación estadística arriba descrita. Con mayor preferencia, este anticuerpo monoclonal detectará esencialmente la misma subpoblación de proBNP nativo del proBNP total que la fijada por MAB 10.4.63, la cual da una correlación $r = 0,98$ o superior según los procedimientos antedichos.

En una forma de ejecución preferida la presente invención también se refiere a un método de producción de un anticuerpo monoclonal, que comprende las etapas de inmunizar con proBNP un animal no humano adecuado, preferiblemente un ratón, una rata o una oveja, obtener células B que produzcan los respectivos anticuerpos, fusionar estas células B con componentes de fusión adecuados y probar la reactividad con proBNP nativo de los anticuerpos producidos por los hibridomas así obtenidos. En un inmunoensayo solo se seleccionan y utilizan preferentemente aquellos anticuerpos monoclonales que en muestras adecuadas de pacientes se correlacionan con el MAB 10.4.63 con un valor r de al menos 0,95. Esta correlación se calcula tal como se ha descrito arriba. La inmunización se lleva a cabo preferentemente con proBNP sintético o un proBNP producido en un huésped procariota o con un péptido sintético o fragmentos de proBNP que contengan, ambos, los aminoácidos 41 hasta 44 de proBNP.

Naturalmente, ahora que se dispone del MAB 10.4.63 también se pueden producir, purificar e identificar anticuerpos policlonales utilizables en la detección específica de proBNP nativo. Ahora se ha encontrado p.ej. que un anticuerpo policlonal (PAB) del proBNP nativo se puede generar, purificar y caracterizar por su correlación con MAB 10.4.63.

Como observará el especialista hay varias vías para producir un PAB que se una a proBNP nativo. Evidentemente se podrá usar p.ej. uno o más péptidos sintéticos como inmunoabsorbente en varias rutas de inmunopurificación exitosas.

Los anticuerpos policlonales de proBNP nativo no se apartarán del espíritu de la presente invención, mientras solo sea detectada una subpoblación de proBNP total correlacionada con un valor r de al menos 0,95 o superior con la subpoblación de proBNP nativo comprendida en la población de proBNP total y fijada por MAB 10.4.63. Dicha correlación se determina usando el sistema Biacore® y el análisis estadístico arriba descrito. Con mayor preferencia, este anticuerpo policlonal detectará esencialmente la misma subpoblación de proBNP nativo del proBNP total que la fijada por MAB 10.4.63. Dicha fijación de básicamente la misma subpoblación da una correlación $r = 0,98$ o superior según los procedimientos antedichos.

Una vía de obtención de dicho PAB de proBNP nativo consiste en inmunizar con proBNP recombinante o producido sintéticamente, purificar por afinidad los anticuerpos específicos de proBNP nativo resultantes y valorar del modo arriba descrito el anticuerpo policlonal así obtenido, usando muestras de pacientes.

Por lo tanto, en una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere a un método para producir anticuerpos policlonales que comprende las etapas de inmunizar con proBNP un animal no humano adecuado, obtener los correspondientes anticuerpos policlonales y probar la reactividad con proBNP nativo de los anticuerpos así obtenidos. Preferiblemente solo se seleccionan y se usan en un inmunoensayo de proBNP aquellos anticuerpos policlonales que en muestras adecuadas de pacientes se correlacionan con el MAB 10.4.63 con un valor r de al menos 0,95. Esta correlación se calcula tal como se ha descrito arriba.

Para cualquier anticuerpo policlonal que se una específicamente a proBNP nativo (usando las mismas muestras y procedimientos) la correlación con MAB 18.4.34, es decir con proBNP total, será significativamente menor que con MAB 10.4.63. Como las preparaciones de anticuerpos policlonales siempre pueden contener anticuerpos individuales con distintas propiedades, la correlación con MAB 18.4.34 para un anticuerpo policlonal que se una específicamente a la subfracción de proBNP nativo del proBNP total será preferiblemente de $r = 0,94$ o menor. Con mayor preferencia será de 0,9 o menor. Preferiblemente, las preparaciones de anticuerpos policlonales que se unan

específicamente a proBNP nativo estarán correlacionadas con MAB 10.4.63 con $r = 0,98$ o superior, y con MAB 18.4.34 con $r = 0,94$ o inferior o, con mayor preferencia, con $r = 0,9$ o menor.

5 La inmunización para obtener anticuerpos policlonales del proBNP nativo se realiza preferentemente con proBNP sintético o un proBNP producido en un huésped procariota o con un péptido sintético o fragmentos de proBNP que contengan, ambos, los aminoácidos 41 hasta 44 de proBNP.

10 En el curso de nuestros experimentos una gran variedad de reactivos inmunológicos ha sido producida, analizada, combinada en varios formatos de ensayo sándwich y empleada en la detección de proBNP. Estas combinaciones diversas de reactivos inmunológicos revelaron que la mayoría de los ensayos parecen medir proBNP total.

En los ensayos de proBNP total estudiados se ha encontrado una correlación razonable con BNP, que corresponde con bastante exactitud al diagnóstico de insuficiencia cardíaca; véase p.ej. Mair, J. antes citado.

15 Sin embargo ahora se ha podido demostrar que un ensayo que solo detecta proBNP nativo distingue mejor entre pacientes de clase NYHA 0 o I y pacientes de clase NYHA II, III o IV, respectivamente, si se compara con un ensayo que detecta proBNP total.

20 Por lo tanto, en una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere a un método para la detección específica de proBNP nativo, el cual incluye las etapas de poner en contacto una muestra que contiene supuesta o ciertamente proBNP con un anticuerpo que se una específicamente a proBNP nativo en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo de proBNP nativo-proBNP nativo, y detectar el complejo formado. Este método de detección específica de proBNP nativo se usa preferentemente para diferenciar las fases NYHA 0 y I de las fases NYHA II, III o IV.

25 El complejo "anticuerpo de proBNP nativo-proBNP nativo" también se puede designar simplemente como complejo "anticuerpo - proBNP nativo".

30 El término "anticuerpo" hace referencia a anticuerpos mono- o policlonales, quiméricos o humanizados, o a otros anticuerpos que pueden obtenerse por ingeniería genética, y también a fragmentos de anticuerpos conocidos del especialista, tales como $F(ab')_2$, Fab' o Fab. Para sustituir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden usar otros agentes de fijación con una especificidad adecuada al proBNP nativo. Solo hay que garantizar la unión específica al proBNP nativo, análogamente al MAB 10.4.63.

35 Como apreciará el especialista hay numerosas vías para detectar proBNP nativo mediante el empleo de un anticuerpo que lo fije específicamente; todas ellas están descritas en libros de texto importantes (véase p.ej. Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990) Elsevier, Amsterdam, o Diamandis y otros, eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston).

40 En el contexto de la presente invención se han analizado por el sistema Biacore[®] muchos reactivos y combinaciones de reactivos para la detección de proBNP total o nativo. En la sección de ejemplos se muestran algunos resultados.

45 En los diagnósticos clínicos rutinarios se usan frecuentemente métodos basados en un formato de inmunoensayo heterogéneo. En una forma de ejecución preferida según la presente invención el método de detección de proBNP nativo es un inmunoensayo competitivo.

Todavía son más preferidos los inmunoensayos según el principio de ensayo sándwich, en los cuales se forma un complejo anticuerpo – antígeno - anticuerpo llamado también sándwich.

50 En una forma de ejecución preferida según la presente invención el método de detección específica de proBNP nativo es un inmunoensayo sándwich, en el cual se usa un primer anticuerpo de proBNP nativo y un segundo anticuerpo de proBNP total de manera que dicho segundo anticuerpo de proBNP y el anticuerpo de proBNP nativo se unen ambos en diferentes epítomos del proBNP nativo, formando un complejo (primer) anticuerpo anti proBNP nativo - proBNP nativo – (segundo) anticuerpo anti proBNP nativo.

55 Como observará el especialista, también puede establecerse un ensayo sándwich para detectar proBNP nativo, usando el anticuerpo de proBNP total como un (primer) anticuerpo de captura y el anticuerpo anti proBNP nativo como segundo anticuerpo (trazador, detector o marcado).

60 Este tipo de método sándwich para determinar el proBNP nativo comprende preferiblemente las siguientes etapas:
 a) mezclar la muestra con el primer anticuerpo específico de proBNP nativo que lleve un grupo adecuado para la fijación a una fase sólida o mezclar la muestra con el primer anticuerpo específico de proBNP nativo ya fijado a una fase sólida,
 b) mezclar esta solución con el segundo anticuerpo de proBNP total que se une a un epítomo fuera del proBNP nativo, presente tanto en el proBNP nativo como en el proBNP total, y lleva un marcador, de modo que se forme un complejo primer anticuerpo-proBNP nativo-segundo anticuerpo,

- c) fijar el complejo inmune resultante a una fase sólida,
- d) separar la fase sólida de la fase líquida,
- e) detectar el marcador en una o en ambas fases.

5 En una determinación cuantitativa se efectúa la misma medición con una cantidad definida de proBNP nativo como patrón y tras la determinación de la muestra se lleva a cabo una etapa f) que consiste en comparar los valores del patrón o de la curva patrón con los valores obtenidos de la muestra, extrapolando la correspondiente concentración de proBNP nativo.

10 El primer anticuerpo específico de proBNP nativo se puede unir a la fase sólida directamente o bien indirectamente mediante un sistema de par de fijación específico. La unión directa a la fase sólida sigue métodos conocidos del especialista, por ejemplo una vía de adsorción. Cuando la unión es indirecta mediante un sistema de par de fijación específico el primer anticuerpo es un conjugado formado por un anticuerpo contra proBNP nativo y un primer componente del par de fijación específico. Un sistema de par de fijación específico significa al menos dos componentes que pueden reaccionar específicamente entre sí. Esta fijación puede estar basada en una unión inmunológica o en otra unión específica. Las combinaciones preferidas son biotina y avidina, estreptavidina o antibiotina, respectivamente, hapteno y anti-hapteno, fragmento Fc de un anticuerpo y anticuerpos contra este fragmento Fc o hidrato de carbono y lecitina. Como sistema de par de fijación específico se usa preferiblemente una combinación de biotina y avidina o de biotina y estreptavidina.

20 El segundo componente del sistema de par de fijación específico se aplica sobre una fase sólida. Preferiblemente se usa estreptavidina o avidina. La unión de este componente del sistema de par de fijación específico a un material soporte insoluble se puede realizar según procedimientos estándar conocidos del especialista. En este caso tanto es apropiada una unión covalente como adsorbente.

25 Como fase sólida sirven tubos de ensayo o placas de microvaloración de poliestireno o de plásticos similares, que se recubren con el segundo componente del sistema de par de fijación específico. También son adecuadas y especialmente preferidas las sustancias particuladas, tales como partículas de látex, partículas magnéticas, tamices moleculares y corpúsculos de vidrio. Asimismo pueden usarse como soportes el papel o la nitrocelulosa. Se prefiere especialmente usar perlas magnéticas recubiertas con el segundo componente del sistema de par de fijación específico arriba descrito. Una vez completada la reacción inmunológica y la unión del complejo inmunológico resultante a la fase sólida, estas micropartículas se pueden separar de la fase líquida, por ejemplo mediante filtración, centrifugación o, en caso de partículas magnéticas, mediante un imán. La detección del marcador unido a la fase sólida (o el marcador remanente en la fase líquida o ambos) se efectúa luego por procedimientos estándar.

35 El segundo anticuerpo que se une al proBNP total se fija a un epítipo que está situado fuera del epítipo del proBNP nativo y se encuentra tanto en el proBNP nativo como en el proBNP total. La unión simultánea de ambos anticuerpos a estos dos epítipos sobre la molécula de proBNP debe ser posible, porque de lo contrario no se formaría ningún complejo sándwich.

40 Los investigadores de la presente invención también han identificado epítipos sobre proBNP que son muy adecuados para el ensayo sándwich arriba descrito.

45 Se ha generado un gran número de anticuerpos monoclonales. Se ha podido demostrar que no todos los epítipos reconocidos sobre proBNP recombinante sirven igualmente para medir proBNP en una muestra de un paciente.

50 Hay tres epítipos formados esencialmente por los aminoácidos 13 - 16, 27 - 31 y 64-67, respectivamente, y reconocidos por los MAB 17.3.1, 18.4.34 y 18.29.23, respectivamente, que parecen estar presentes en la gran mayoría de moléculas de proBNP (N-terminales), es decir, que son epítipos del proBNP total. Estos hibridomas han sido depositados en el DSMZ el día 07.05.03. Los anticuerpos producidos por estos hibridomas son herramientas ideales para medir proBNP total. Si se usan solos en un formato de ensayo competitivo o combinados entre sí o con un PAB que reaccione con proBNP total en un ensayo sándwich, se puede medir fácilmente el proBNP total.

55 Las líneas celulares de hibridoma preferidas según la presente invención, MAB<NT-proBNP>16.1.39 (= MAK<NT-proBNP>16.1.39 = MAB 16.1.39), MAB<NT-proBNP>17.3.1, MAB<NT-proBNP>10.4.63, MAB<NT-proBNP>18.4.34 y MAB<NT-proBNP>18.29.23, se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [*Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares, S.L.*] (DSMZ), Alemania, conforme al tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento en materia de patentes:

Línea celular	Nº de depósito	Fecha de depósito
MAK<NT-proBNP>16.1.39	DSM ACC 2590	07.05.03
MAK<NT-proBNP>17.3.1	DSM ACC 2591	07.05.03
MAK<NT-proBNP>18.4.34	DSM ACC 2592	07.05.03
MAK<NT-proBNP>18.29.23	DSM ACC 2593	07.05.03
MAK<NT-proBNP>10.4.63	aún no conocido	27.04.04

Los anticuerpos obtenibles de dichas líneas celulares son formas de ejecución preferidas de la presente invención.

En la detección del proBNP nativo se usa preferiblemente un anticuerpo monoclonal de proBNP total, como el arriba descrito, en un ensayo sándwich, combinado con un anticuerpo que se une específicamente a proBNP nativo. Luego este sándwich se convierte en un ensayo para detectar específicamente solo la subpoblación de proBNP nativo del proBNP total. En este sándwich para la medición del proBNP nativo los anticuerpos de proBNP total preferidos son aquellos que se unen a los aminoácidos 13-16, 27-31 y 64-67, respectivamente. Estos epítomos son reconocidos, por ejemplo, por los MAB 17.3.1, 18.4.34 y 18.29.23, respectivamente. En este ensayo sándwich para proBNP nativo se usa con mayor preferencia un anticuerpo que se une a los aminoácidos 27 a 31, como el MAB 18.4.34. Todos los líquidos biológicos conocidos del especialista pueden usarse como muestra en un método de detección específica de proBNP nativo in vitro. Las muestras preferidas para el diagnóstico in vitro son fluidos corporales como sangre entera, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina o saliva. Se prefiere particularmente el uso de suero o plasma, respectivamente.

Además de las llamadas pruebas húmedas, como las descritas arriba, con reactivos de ensayo en una fase líquida, también se pueden emplear todos los formatos estándar de ensayo seco para la detección de antígenos, haptenos, péptidos, proteínas, anticuerpos, etc. Estas pruebas secas o tiras de ensayo, como por ejemplo las descritas en la patente EP-A-0 186 799, combinan todos los componentes de ensayo sobre un solo soporte, excepto la muestra que debe ser analizada.

En una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere a un método para diagnosticar insuficiencia cardíaca que comprende la detección de proBNP nativo y la correlación del nivel de proBNP nativo con la presencia de insuficiencia cardíaca. Como observará el especialista, el nivel de proBNP nativo también se puede emplear para valorar la ausencia o la gravedad de la insuficiencia cardíaca.

También se prefiere usar una medición de proBNP nativo para el seguimiento de pacientes de insuficiencia cardíaca y para controlar el tratamiento.

Otra forma de ejecución preferida se refiere a un kit para medir proBNP nativo, que comprende un anticuerpo de unión específica a proBNP nativo y reactivos auxiliares para detectarlo.

Los siguientes ejemplos, referencias, listas de secuencias y figuras se ofrecen para facilitar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1: identificación de epítomos para MAB 10.4.63

Se ha analizado el perfil de reactividad del MAB 10.4.63 empleando 69 péptidos octámeros biotinilados derivados de la secuencia de proBNP (1-76), cada uno de ellos obtenido por desplazamiento de un aminoácido, a fin de cubrir la secuencia completa de proBNP (1-76). La extinción se expresa en unidades mE. Se ha encontrado una fuerte reactividad con los péptidos 37 y 38.

Figura 2: ajustes del aparato para los análisis Biacore

La especificidad de los diversos anticuerpos de proBNP para el proBNP nativo se ha evaluado mediante el modo operativo del analizador Biacore® 3000 indicado en esta figura.

Figuras 3 a 8: correlación de MAB 10.4.63 con varios anticuerpos mono- y policlonales anti-proBNP

En un ensayo tipo sándwich se han analizado 20 sueros humanos con una concentración de proBNP de aproximadamente 10 mg/ml y superior (determinada mediante MAB 10.4.63 y proBNP sintético como calibrador), empleando el analizador Biacore 3000. Los valores medidos con MAB 10.4.63 están en el eje x. Los valores correspondientes determinados con el anticuerpo empleado en la comparación de métodos están en el eje y. En las figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se representan respectivamente las correlaciones de MAB 10.4.63 con MAB 16.1.39, MAB 18.4.34, MAB 18.29.23, PAB 30-38, PAB 44-51 y PAB 41-46.

Ejemplo 1

Método de producción de proBNP (1-76) N-terminal recombinante

1. Clonación del proBNP N-terminal recombinante

La secuencia nucleótida del proBNP N-terminal (secuencia de aminoácidos 1-76) se produjo por síntesis genética. Para obtener una expresión óptima del gen en *E.coli* la secuencia de ADN se adaptó a los codones de uso más frecuente en *E.coli*. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para producir el gen son las siguientes:

Pro5' (SEQ ID NO: 1):
5'CCGGATCCCACCCGCTG3'

Pro1hum (SEQ ID NO: 2):
5'CGGGATCCCACCCGCTGGGTTCCCCGGGTTCCGCTTCCGACCTGAAAC
CTCCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACCT3'

Pro2hum (SEQ ID NO: 3):
5'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTCAACCTGCAGTTCGGACAGTTTACCCTGCA
GGTGGTTACGCTGTTCTCTGC3'

Pro3hum (SEQ ID NO: 4):
5'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTT
GGAAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3'

Pro4hum (SEQ ID NO: 5):
5'CCCAAGCTTAACGCGGAGCACGCAGGGTGTACAGAACCATTTTACGGTG
ACCACGGATACCTTCGGTAGCAACTTCACGGGATTTCC3'

Pro3' (SEQ ID NO: 6):
5'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3'

El gen se produjo por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) empleando estos cebadores. El gen amplificado se clonó en un vector adecuado, por ejemplo el vector pUC19, y luego se secuenció. Para clonarlo en el vector de expresión pQE8, el gen se recortó del vector pUC19 por los puntos de restricción Bam HI y Hind III y luego se ligó en el vector pQE8, permitiendo una expresión de proteínas con cola de histidina N-terminal, y se transformó en *E.coli* M15 [pREP4].

2. Expresión del proBNP N-terminal in *E.coli*

Para la expresión del gen en *E.coli* se transfectó un cultivo nocturno de clon recombinante de *E.coli* 1/60 en caldo Luria (con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina) y se indujo a una DO 550 de 1 con IPTG (isopropiltiogalactósido; concentración final 1 mM). Después de la inducción los cultivos se incubaron 4 horas más a 37°C, luego se centrifugaron y el precipitado se recogió en tampón de fosfato-Na 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM. Después de descomponerla por ultrasonidos, la suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante se introdujo en una columna de Ni-NTA (nitrilo-triacetato). Tras una etapa de lavado con tampón de fosfato-Na 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, el proBNP N-terminal con cola de histidina se eluyó con tampón de fosfato-Na 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM, imidazol 300 mM. Las fracciones eluidas se juntaron y se dializaron contra Tris 50 mM, pH 8,0. El producto dializado se introdujo en una columna de Q-sefarosa para separar impurezas. La masa del proBNP N-terminal purificado se determinó por MALDI-TOF. Se halló que esta preparación (= proBNP recombinante) contenía proBNP 1-76 y proBNP 1-66, siendo este último muy probablemente un producto de degradación.

Ejemplo 2

Síntesis de NTproBNP(1-76)amida

La NTproBNP(1-76)amida (swissprot: nº de acceso P16860; aa 27 hasta aa 134) se sintetizó siguiendo un protocolo optimizado de síntesis peptídica en fase sólida (Merrifield (1962) Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 21, 412) en un sintetizador de péptidos ABI 433. En resumen, el péptido se construyó sobre una fase sólida de poliestireno modificado con un espaciador Rink, conjugando repetidamente un exceso óctuple de aminoácidos, cada uno de ellos protegido por grupos temporales Fmoc lábiles a la piperidina y grupos permanentes tBu, BOC, OtBu, Trt o Pmc lábiles en medio ácido, según la función de la cadena lateral. Para obtener un material estable a la oxidación la metionina en posición 10 se sustituyó por el aminoácido equivalente norleucina. Además, para estabilizarlo contra la degradación proteolítica el extremo C se amidó mediante acoplamiento Rink. Tras el montaje, el péptido totalmente protegido se separó de la fase sólida y los grupos protectores permanentes se eliminaron por tratamiento con ácido trifluoroacético en una mezcla de captadores adecuados de cationes; por último se aisló purificándolo por HPLC preparativa de fase inversa. Tres síntesis a una escala de 125 µmoles dieron respectivamente 16,0, 17,1 y 18,0 mg de sustancia pura (liofilizada) con pico único en la RP-HPLC. La identidad se comprobó por espectroscopia de masas MALDI y ESI [8439,4].

Ejemplo 3

Producción e identificación de anticuerpos monoclonales contra proBNP total o nativo, respectivamente

1. Obtención de anticuerpos monoclonales contra proBNP N-terminal

Se inmunizan por vía intraperitoneal ratones Balb/c de 8-12 semanas de edad con 100 µg de antígeno proBNP N-terminal y adyuvante de Freund completo. En los ratones se ha usado como antígeno tanto proBNP recombinante como proBNP (1-76) producido por síntesis peptídica, respectivamente. Al cabo de 6 semanas se llevan a cabo tres inmunizaciones más a intervalos de 4 semanas. Una semana después de la última inmunización se extrajo sangre y se determinó la concentración de anticuerpo en el suero de los animales del ensayo. Del bazo de los ratones con reacción positiva se obtienen linfocitos B y se fusionan con una línea celular permanente de mieloma. La fusión se realiza según el método bien conocido de Köhler y Millstein (Nature 256, 1975, p. 495-497). Los cultivos primarios de los hibridomas positivos se clonan del modo usual, por ejemplo usando el selector celular comercialmente disponible o por "dilución límite".

Para producir ascitis se inyectan 5×10^6 células de hibridoma por vía intraperitoneal a ratones Balb/c previamente tratados 1-2 veces con 0,5 ml de pristano. Después de 2-3 semanas se puede obtener líquido de ascitis de la región abdominal de los ratones y de ahí pueden aislarse los anticuerpos del modo habitual.

2. Ensayo de identificación de anticuerpos monoclonales contra péptidos de proBNP, proBNP sintético y proBNP en suero humano, respectivamente

Para identificar la presencia de anticuerpos contra proBNP en el sobrenadante del cultivo de células de hibridoma, los sobrenadantes se evaluaron según tres formatos de ensayo de cribado.

a) Reactividad con proBNP N-terminal sintético

Se fijan placas de microvaloración (Nunc, Maxisorb) con 2,5 µg/ml de NT-proBNP sintético como antígeno en un tampón de carga (tampón de recubrimiento, nº de cat. 0726 559, de Scil Diagnostics, GmbH), 100 µl/pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente, agitando. La carga posterior se realiza en tampón PBS (suero fisiológico tamponado con fosfato, Oxid, código-BR 14a) y 1% de Byco C durante 30 minutos. A continuación se lava con tampón de lavado (solución de cloruro sódico al 0,9% con 0,05% de Tween 20). La muestra de anticuerpo se incuba con 100 µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente, agitando. Luego se lava nuevamente dos veces con solución de lavado. Después se realiza otra incubación con el anticuerpo detector PAB<M-Fcy>F(ab')₂ de cabra conjugado con peroxidasa (Chemicon, nº de cat. AQ127P), 100 mU/ml, 100 µl/pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente, agitando. Tras otra etapa de lavado con tampón de lavado se determina la actividad de la peroxidasa del modo habitual (por ejemplo con ABTS[®] durante 30 minutos a temperatura ambiente; la diferencia de extinción se lee en mU a 405 nm mediante un lector ELISA).

b) Caracterización de epítomos mediante análisis con péptidos sintéticos

Para el análisis de epítomos se incuban placas de microvaloración, recubiertas de estreptavidina, con conjugados de péptido-biotina derivados de la secuencia de proBNP (1-76). Se exploró la secuencia completa de proBNP aplicando 69 péptidos octámeros, cada uno de ellos obtenido por desplazamiento de un aminoácido a lo largo de la secuencia, es decir 1-8, 2-9, 3-10, 4-11 hasta 66-73, 67-74, 68-75 y 69-76, respectivamente. Además se han ensayado secuencias biotiniladas que comprenden las posiciones de los aminoácidos 1-10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 32-43, 39-50, 47-57, 50-63, 62-70 y 64-76, respectivamente. Los péptidos antígenos individuales se han disuelto a 250 ng/ml en tampón PBS (suero fisiológico tamponado con fosfato, Oxid, código-BR 14a) con 0,5% de Byco C. Para aplicar los péptidos se han repartido 100 µl de cada solución en distintos pocillos de las placas de microvaloración, que luego se han agitado suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavó con tampón de lavado (solución de cloruro sódico al 0,9% con 0,05% de Tween 20). La incubación de la muestra de anticuerpo y la reacción de detección se efectúan tal como se ha descrito en a). Debido a su reactividad con ciertos péptidos de NT-proBNP se pudo trazar la posición del epítomo reconocido por un anticuerpo mono- o policlonal.

En la figura 1 se muestra un ejemplo de un PepScan. El anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma 10.4.63 reacciona más fuertemente con los péptidos 36 a 38, lo cual corresponde a un epítomo compartido que consta de los aminoácidos 38 hasta 43 (SEQ ID NO: 11) del proBNP. Como la reactividad más fuerte se observa claramente con los péptidos 37 y 38, se puede considerar que el epítomo compartido comprende los aminoácidos 38-42.

c) Reactividad con proBNP en una muestra de un paciente

Se recubren placas de microvaloración (Nunc, Maxisorb) con 5 µg/ml de PAB<proBNP humano>S-IgG (IS, (1-21) o 30-38)S-IgG en tampón de carga (tampón de recubrimiento, nº de cat. 0726 559, de Scil Diagnostics, GmbH), 100 µl/pocillo, durante 1 hora a la temperatura ambiente, agitando. La carga posterior se realiza en tampón PBS (suero fisiológico tamponado con fosfato, Oxid, código-BR 14a) y 1% de Byco C durante 30 minutos. A continuación se lava con tampón de lavado (solución de cloruro sódico al 0,9% con 0,05% de Tween 20). La incubación con antígeno nativo en plasma de paciente, diluido en tampón PBS, se realiza con 100 µl/pocillo, durante 1 hora a la temperatura ambiente, agitando. Tras otra etapa de lavado el sobrenadante de hibridoma se incuba con 100 µl/pocillo, durante 1

hora a la temperatura ambiente, agitando. A continuación se lava dos veces con solución de lavado y se efectúa otra incubación con el anticuerpo detector PAB<M-Fcy>F(ab')₂ de cabra conjugado con peroxidasa (Chemicon, n° de cat. AQ127P), 100 mU/ml, 100 µl/pocillo, durante 1 hora a la temperatura ambiente, agitando. Tras otra etapa de lavado con tampón de lavado se determina la actividad de la peroxidasa del modo habitual (por ejemplo con ABTS® durante 30 minutos a temperatura ambiente; la diferencia de extinción se lee en mU a 405 nm mediante un lector ELISA).

Solo se han seguido procesando aquellos cultivos de hibridoma que reaccionaron positivamente con proBNP N-terminal producido sintéticamente o con proBNP en suero humano.

10 **Ejemplo 4**

Producción de anticuerpos policlonales contra proBNP N-terminal

15 **1. Inmunización**

Se inmunizaron ovejas con proBNP N-terminal recombinante (véase ejemplo 1) en adyuvante de Freund completo. La dosis fue 0,1 mg per animal. Las inmunizaciones se repitieron a intervalos de 4 semanas durante un periodo de 10 meses. Al cabo de 6 meses de la primera inmunización y luego una vez al mes se tomaron las muestras de suero para analizar su sensibilidad y concentración.

20 **2. Purificación de los anticuerpos policlonales del suero de oveja**

Partiendo del suero crudo de una oveja inmunizada con proBNP N-terminal recombinante se eliminaron los componentes lípidos por deslipidación con Aerosil® (1,5%). Luego se separaron las inmunoglobulinas por precipitación con sulfato amónico (2 M). El precipitado disuelto se dializó contra KPO₄ 15 mM, NaCl 50 mM pH 7,0 y se cromatografió sobre DEAE-sefarosa. La fracción IgG (= PAB<NT-proBNP>S-IgG(DE)) se obtuvo en la elución.

25 **3. Cromatografía de afinidad para producir anticuerpos policlonales específicos del proBNP total**

30 Para la purificación por afinidad de los anticuerpos policlonales que se unen específicamente a proBNP total (= PAB<NT-proBNP>SIgG (IS,1-21), o brevemente PAB<1-21>) se usó el péptido HPLGSPGSASDLETSGLQEQR-C ((1-21)21-Cys, SEQ ID NO: 7). La matriz de afinidad se produjo por unión covalente de 1 mg del péptido (1-21)21-Cys a 2 ml de EAH-sefarosa 4B (Amersham Biosciences, producto n° 17-0569-01) activada con maleimida.

35 Se rellenó una columna con 10 ml de la matriz de afinidad y se equilibró con KPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,5 (PBS). Se introdujeron 2 g de PAB<NT-proBNP>S-IgG(DE) en la columna y se lavó con PBS y KPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, 0,1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato-Na, pH 7,5. La IgG unida específicamente a la matriz de afinidad se eluyó con tampón de elución ImmunoPure® Gentle Ag/Ab (Pierce, producto n° 21013) y se designa como PAB<1-21>. La matriz de afinidad se regeneró con ácido propiónico 1 M y se conservó en PBS/NaN₃.

40 Se empleó un procedimiento similar para generar los anticuerpos policlonales purificados PAB<NT-proBNP>S-IgG (IS, 30-38), o brevemente PAB<30-38>) específicos del proBNP total (Karl, J. y otros, WO 00/45176).

45 **4. Cromatografía de afinidad para producir anticuerpos policlonales específicos del proBNP nativo**

El anticuerpo policlonal del proBNP nativo (= PAB<NT-proBNP>S-IgG (IS, 41-46), o brevemente PAB<41-46>) se obtuvo por cromatografía de afinidad secuencial. Del mismo modo arriba descrito se usaron 3 péptidos individuales, CEUEUSLEPLQE ((37-43)37-Cys, SEQ ID NO: 8), CEUEU-SPRPTGVW ((44-51)44-Cys, SEQ ID NO: 9) y C-EPLQESPRPTG ((39-50)39-Cys, SEQ ID NO: 10) (EUEU funciona meramente como extendedor acoplado al péptido que sigue) para producir 3 matrices de afinidad individuales. Primero se aplicó el PAB<NT-proBNP>S-IgG(DE) a la matriz de afinidad que llevaba el péptido (37-43)37-Cys, a fin de eliminar cualquier anticuerpo policlonal unido principalmente a la secuencia 37-43 del NT-proBNP. Luego se aplicó el producto de la elución a la segunda matriz de afinidad que llevaba el péptido (44-51)44-Cys, a fin de capturar los anticuerpos policlonales unidos principalmente a la secuencia 44-51 del NT-proBNP. Los anticuerpos fijados fueron eluidos y recogidos del modo arriba descrito (= PAB<44-51>). Finalmente el producto de elución de la segunda purificación se aplicó sobre la tercera matriz de afinidad que llevaba el péptido (39-50)39-Cys. Los anticuerpos fijados fueron eluidos y recogidos del modo arriba descrito. Los anticuerpos eluidos de la tercera matriz de afinidad, determinados por el método conocido y designado como análisis PepScan, son epítomos específicos en la secuencia 41-46 (= PAB<41-46>) y representan los epítomos restantes del solapamiento entre las secuencias 37-43 y 44-51.

60 **Ejemplo 5**

Análisis Biacore de los anticuerpos monoclonales y policlonales de proBNP

65 La especificidad de los anticuerpos monoclonales y policlonales para el NT-proBNP nativo se determinó por resonancia de plasmón superficial con un analizador Biacore 3000. Todas las mediciones de resonancia de plasmón

superficial se efectuaron a 25°C empleando el Biacore 3000 equipado con un chip sensor de nivel CM5. El tampón de flujo fue HBS (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM y 0,005% de P20 (= polisorbato) a pH 7,4).

1. Inmovilización del ligando PAB<NT-proBNP, 1-21>S-IgG

5 El ligando empleado para capturar anticuerpos de NT-proBNP total se inmovilizó mediante el uso de la química de acoplamiento amínico. Antes del acoplamiento el chip sensor se preacondicionó a un flujo de 20 µl/min mediante inyecciones de 10 µl de 0,1% de SDS, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y ácido fosfórico 100 mM. Las superficies de todas las celdas de flujo se activaron durante 5 minutos con una mezcla 1:1 de NHS (N-hidroxisuccinimida) 0,1 M y EDC (3-(N,N-dimetil-amino)propil-N-etilcarbodiimida) 0,1 M a un caudal de 20 µl/min. El ligando se inyectó en las 4 celdas de flujo durante 5 minutos, con una concentración de 30 µg/min en acetato sódico 10 mM a pH 5,0. Las superficies se bloquearon con una inyección de 5 minutos de etanolamina 1 M a pH 8,0 seguida de 30 segundos de inyecciones de lavado con HBS (HEPES 100mM a pH 7,4, NaCl 1,5 M, EDTA 3,4 mM, 0,05% de P20 (= polisorbato), 2% de DMSO), HCl 100 mM y 2 x ácido fosfórico 100 mM, para eliminar el ligando no unido por enlace covalente. La densidad del ligando fue de 16.000 RU aproximadamente.

2. Mediciones de concentración de NT-proBNP en muestras de pacientes

20 Para llevar a cabo el siguiente método en Biacore 3000 se usó el programa adjuntado en la figura 2. Para calibrar se utilizó NTproBNP (1-76)amida sintética a concentraciones de 0, 2,5, 5, 10, 20 y 40 nM en suero de caballo al 20% (diluido 1:5 con HBS + 1 mg/ml de carboximetildextrano). Se agregó el carboximetildextrano para suprimir componentes del suero no unidos específicamente a la superficie del chip sensor.

25 Las muestras de pacientes con > 10 ng/ml de NT-proBNP nativo se diluyeron 1:5 con HBS que contenía igualmente 1 mg/ml de carboximetildextrano.

30 El calibrador y las muestras de los pacientes se inyectaron durante 10 minutos a un caudal de 10 µl/min a través de las cuatro celdas de flujo y luego se inyectó HBS durante 30 segundos a un caudal de 100 µl/min para eliminar componentes del suero no unidos específicamente. El anticuerpo cuya especificidad había que determinar se inyectó a una concentración de 500 nM en HBS durante 3 minutos y a un caudal de 10 µl/min. El anticuerpo 1 en la celda 1, el anticuerpo 2 en la celda 2 y así sucesivamente. Los datos de fijación de los anticuerpos en RU se determinaron por diferencia entre la respuesta 10 s antes de la inyección de un anticuerpo y la respuesta 10 s antes de la inyección del siguiente anticuerpo o de HBS, respectivamente.

35 Para calcular las concentraciones de NT-proBNP en las muestras de pacientes se usó el programa BIAevaluation versión 4.1. Para cada anticuerpo se generó una curva de calibración con NTproBNP (1-76)amida, empleando un ajuste de tipo “spline” (definido por porciones polinómicas), y se calcularon las concentraciones correspondientes de las muestras de pacientes diluidas 1:5. Las concentraciones se multiplicaron por 5 para obtener las concentraciones de NT-proBNP en los sueros sin diluir.

3. Determinación de la especificidad de un anticuerpo

45 Para distinguir si un anticuerpo se une a NT-proBNP nativo o total en suero humano se representaron gráficamente las concentraciones de NT-proBNP determinadas con el anticuerpo en cuestión (eje y) frente a las concentraciones de la muestra correspondiente determinadas con el anticuerpo de referencia MAB 10.4.63 (eje x). Se ajustó una curva de regresión del tipo $y = ax + b$ mediante MS-Excel y se calculó el coeficiente de correlación r y la pendiente.

Tabla 1: Características de varios anticuerpos anti-proBNP

Anticuerpo	Epítipo reconocido	proBNP sintético	proBNP de muestra de paciente
MAB 17.3.1	Aminoácidos 13-16	+++	+++
MAB 18.4.34	Aminoácidos 27-31	+++	+++
MAB 18.29.23	Aminoácidos 62-76	+++	+++
MAB 10.4.63	Aminoácidos 38-44	+++	+
MAB 16.1.39	Aminoácidos 38-43	+++	+
PAB <1-21>	Aminoácidos 1-21	+++	+++
PAB <44-51>	Aminoácidos 44-51	+++	++
PAB <41-46>	Aminoácidos 41-46	+++	+
+++ indica que tanto el proBNP sintético como el proBNP en una muestra de paciente se reconocen muy bien y en grado similar			
+ indica una reacción del orden del 15% con proBNP en una muestra de paciente comparado con el valor obtenido con proBNP sintético			

50 De la tabla 1 se desprende fácilmente que la gran mayoría de epítipos de proBNP parece estar presente del mismo modo en el proBNP sintético y en el proBNP comprendido en una muestra de paciente, lo cual se ejemplifica con los anticuerpos MAB 17.3.1, MAB 18.4.34, MAB 28.29.13 y PAB <1-21>, respectivamente.

Sin embargo hay un epítipo que al parecer no está presente del mismo modo en el proBNP sintético y en el proBNP comprendido en una muestra de paciente. Este epítipo consta esencialmente de los aminoácidos 41-44 y es reconocido tanto por MAB 10.4.63 como por PAB <41-46>. Parece que empleando estos reactivos inmunológicos solo se reconoce una subpoblación del proBNP total presente en una muestra de paciente. Esto lleva a resultados sorprendentemente distintos cuando se mide proBNP en una muestra de paciente con un ensayo para proBNP total o con un ensayo para proBNP nativo, respectivamente. Solo esta subpoblación de proBNP total parece llevar un epítipo característico del proBNP nativo.

Como se ve en las figuras 3 a 8, todos los anticuerpos de proBNP nativo, es decir MAB 16.1.39 y PAB<41-46>, muestran muy buena correlación con MAB 10.4.63, mientras que los anticuerpos de proBNP total, es decir MAB 18.4.34, MAB 18.29.23 y PAB 30-38 presentan una correlación mucho menor con MAB 10.4.63. Es interesante que el PAB <44-51> parece tener una reactividad mixta y por lo tanto no sería adecuado como anticuerpo de unión específica al proBNP nativo, porque su correlación con MAB 10.4.63 es inferior a $r = 0,95$.

Ejemplo 6

Comparación clínica de ensayos para proBNP nativo y total, respectivamente

En un estudio clínico se han analizado 246 muestras de pacientes, clasificadas según su estatus NYHA, mediante inmunoensayos sándwich para proBNP nativo y proBNP total respectivamente. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Análisis comparativo de proBNP nativo y proBNP total en muestras de pacientes

NYHA	n 246	proBNP nativo unidades arbitrarias	NYHA X / NYHA 0	proBNP total pg/ml	NYHA X / NYHA 0
0	119	337	1,0	638	1,0
1	32	355	1,1	717	1,1
2	62	655	1,9	1072	1,7
3	30	2947	8,7	3609	5,6
4	3	12755	38	15902	25

Clínicamente es muy importante distinguir entre pacientes sin ninguna enfermedad o con una enfermedad muy leve (clases NYHA 0 y 1) y pacientes con la enfermedad en progresión (NYHA X = clase 2 o superior). Como se puede observar en la tabla 2 hay un notable aumento desde la clase 0/1 hasta la clase 2 y superiores. Este incremento en las clases 2, 3 y 4 es más pronunciado para el proBNP nativo que para el proBNP total, lo cual se traduce en un mejor perfil de sensibilidad/especificidad y utilidad clínica del proBNP nativo en comparación con el proBNP total.

Lista de referencias

Buckley, M.G., y otros, Clin. Sci. 95 (1998) 235-239
 Cleland, J.G., y otros, Heart 75 (1996) 410-413
 Diamandis y otros, eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston
 EP-A-0 186 799
 EP-A-0 542 255
 Goetze, J.P., y otros, Clin. Chem. 48 (2002) 1035-1042
 Hughes, D., y otros, Clin. Sci. 96 (1999) 373-380
 Hunt, P.J., y otros, Peptides 18 (1997) 1475-1481
 Hunt, P.J., y otros, Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183
 Hunt, P.J., y otros, Clinical Endocrinology 47 (1997) 287-296
 Köhler, G. and Millstein, C., Nature 256 (1975) 495-497
 Mair, J., Clin. Chem. 48 (2002) 977-978
 Mair, J., y otros, Clin. Chem. Lab. Med. 39 (2001) 571-588
 Masuta, C., y otros, Clin. Chem. 44 (1998) 130
 Merrifield, R.B., Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 21 (1962) 412
 Sudoh, T., y otros, Nature 332 (1988) 78-81
 Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays [*Práctica y teoría de los inmunoensayos enzimáticos*] 11 (1990), todo el libro, especialmente las páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam
 Tsuji, T., y otros, Clin. Chem. 40 (1994) 672-673
 Urban & Schwarzenberg, 1993, Roche Medical Dictionary
 US 5,786,163
 US 2003/0219734
 WO 00/35951
 WO 00/45176
 WO 93/24531

Lista de secuencias

<110> Roche Diagnostics GmbH
 F. Hoffmann-La Roche AG
 5 <120> Método para detectar proBNP nativo
 <130> 21732 WO
 <150> EP 03010591.0
 <151> 2003-05-12
 <160> 11
 10 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 15 <400> 1
 ccggatccca cccgctg
 17
 <210> 2
 <211> 79
 20 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 2
 ccggatccca cccgctgggt tccccgggtt ccgcttccga cctggaaacc tccggtctgc 60
 aggaacagcg taaccacct
 25 79
 <210> 3
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 30 <400> 3
 cggttccagg gaggtctgtt caacctgcag ttcggacagt ttacctgca ggtggttacg 60
 ctgttctctgc
 70
 <210> 4
 35 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 4
 cagacctccc tgaaccgct gcaggaatcc ccgctccga ccggtgttg gaaatcccg 60
 gaagtgcta c 71
 <210> 5
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 45 <400> 5
 cccaagctta acgaggagca cgcagggtgt acagaacat ttacggtga ccacggatac 60
 ctccgtagc aacttcacgg gattcc 87
 <210> 6
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 6
 cccaagctta acgaggagc 19
 <210> 7
 55 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Leu Gln Glu Gln Arg
 20
 60 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT

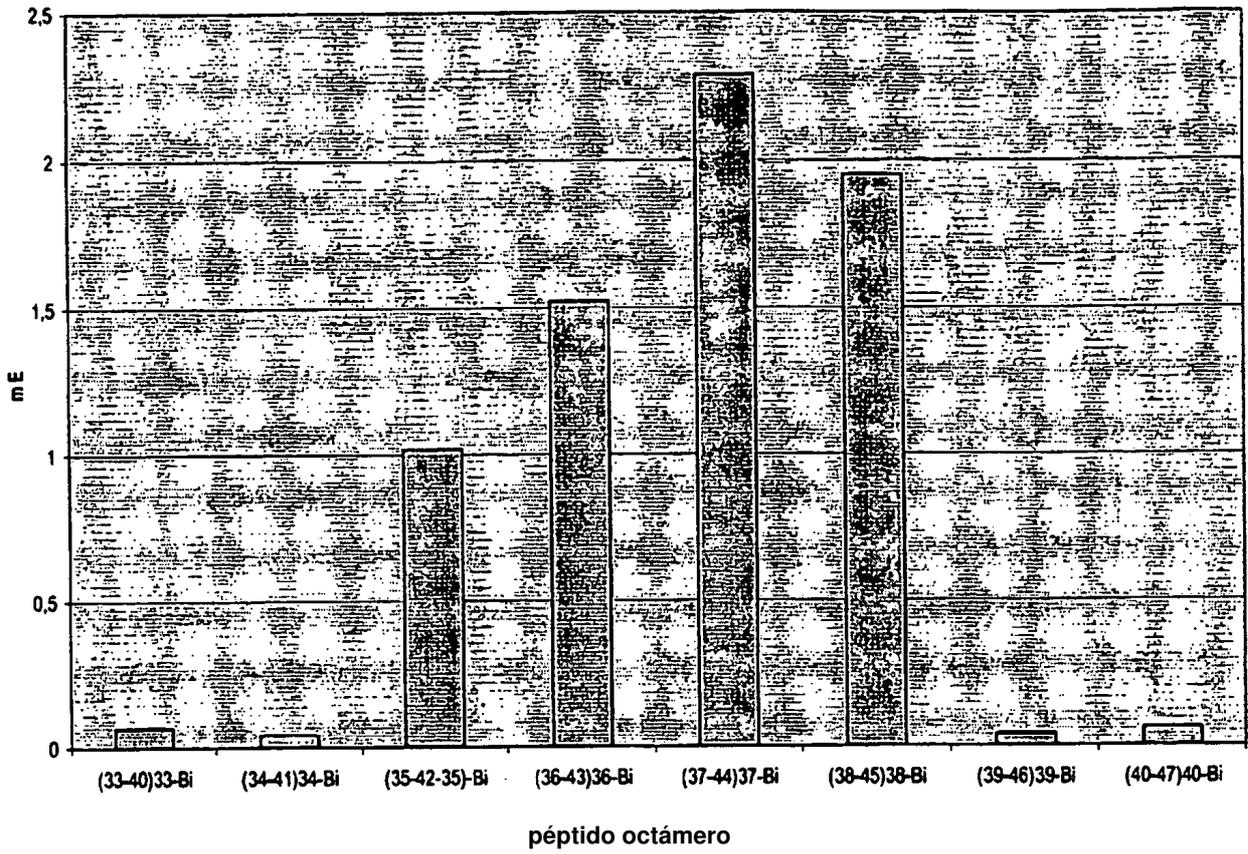
REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a proBNP, el cual se fija específicamente a un epítipo formado por los aminoácidos 38 a 43 (SEQ ID NO: 11) de proBNP y que, por los valores de proBNP determinados en muestras de pacientes mediante el uso de dicho anticuerpo, se correlaciona con un valor r de al menos $r = 0,95$ o superior con los valores de proBNP medidos en dichas muestras al usar el anticuerpo monoclonal MAB 10.4.63 producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo DSM ACC2654 en la DSMZ, siendo dicho valor r determinado por análisis de regresión lineal.
- 10 **2.** El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que es el MAB 10.4.63 producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo DSM ACC2654 en la DSMZ.
- 15 **3.** Un método para la detección específica de proBNP in vitro que comprende las etapas de poner en contacto una muestra que contenga proBNP, supuesta o ciertamente, con un anticuerpo de proBNP según la reivindicación 1 o 2, en condiciones tales que permitan la formación de un complejo anticuerpo de proBNP-proBNP, y detectar el complejo formado.
- 20 **4.** El método según la reivindicación 3, por el cual dicha detección se lleva a cabo mediante un inmunoensayo competitivo.
- 25 **5.** El método según la reivindicación 3, por el cual dicha detección se lleva a cabo mediante un inmunoensayo sándwich usando además un segundo anticuerpo de proBNP, de modo que dicho segundo anticuerpo de proBNP y el anticuerpo de proBNP según la reivindicación 1 o 2 se unen a la misma subpoblación de proBNP, formando así un segundo complejo anticuerpo de proBNP-proBNP-anticuerpo de proBNP.
- 30 **6.** Un método para diagnosticar insuficiencia cardíaca in vitro que comprende la detección específica de proBNP mediante el uso de un anticuerpo según la reivindicación 1 o 2 y la determinación de la correlación del nivel de proBNP con la insuficiencia cardíaca.
- 35 **7.** Un kit para medir proBNP, que comprende un anticuerpo según la reivindicación 1 o 2 y reactivos auxiliares para la detección de proBNP.
- 8.** La línea celular de hibridoma MAB 10.4.63 depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM ACC2654.

Fig. 1

5

Mab<NT-proBNP>M-10.4.63



10

Fig. 2a

Programa para la determinación de NT-proBNP en 20 muestras de pacientes con 8 anticuerpos distintos en Biacore, escrito y ejecutado con el programa BIACORE 3000 Control Software versión 4.1

5 **DEFINIR APROG Sándwich**
PARAM %apo %anr %aco %bnr %bco %c1po %c1nr %c1co %c2po %c2nr %c2co %c3po %c3nr %c3co %c4po %c4nr %c4co

CLAVE anr %anr
CLAVE aco %aco
CLAVE bnr %bnr
CLAVE bco %bco
CLAVE c1nr %c1nr
CLAVE c1co %c1co
CLAVE c2nr %c2nr
CLAVE c2co %c2co
CLAVE c3nr %c3nr
CLAVE c3co %c3co
CLAVE c4nr %c4nr
CLAVE c4co %c4co

10 **TÍTULO Sándwich : AG: %anr %aco con %bnr %bco, AB: %c1nr, %c2nr, %c3nr, %c4nr**

Flujo 10 -f
Ruta de flujo 1,2,3,4

Aguja inmersa r2e1
***Inyección rápida %apo 100 calibrador/suero**
-0:10RPunto -b BL_inicio

Flujo 100
***Inyección rápida r2f6 50 !HBS**

Flujo 10 -f

Ruta de flujo 1
Aguja inmersa r2e2
***Inyección rápida %c1po 30 !AB1/5**
-0:10RPunto -b AG

Ruta de flujo 2
Aguja inmersa r2e3
***Inyección rápida %c2po 30 !AB2/6**
-0:10RPunto -b AB1

Ruta de flujo 3
Aguja inmersa r2e4
***Inyección rápida %c3po 30 !AB3/7**
-0:10RPunto -b AB2

Ruta de flujo 4
Aguja inmersa r2e5
***Inyección rápida %c4po 30 !AB4/8**
-0:10RPunto -b AB3

Fig. 2b

```

Ruta de flujo 1,2,3,4
Flujo 100

*Inyección rápida r2f7 50 !HBS
-0:10RPunto -b AB4

Flujo 20

*Inyección rápida r2e10 5 !HBSlavado
*Inyección rápida r2f3 10 !HCl 100 mM
*Inyección rápida r2f4 10 !ácido fosfórico 100 mM
*Inyección rápida r2f5 10 !ácido fosfórico 100 mM
EXTRALIMPIO |
3:30 RPunto BL_fin !línea base tras regen. ciclo
FIN
    
```

```

5  DEFINIR APROG Regen.
    TÍTULO regeneración ciclo
    Flujo 20
    Ruta de flujo 1,2,3,4
    *Inyección rápida r2e10 5 !HBSlavado
    -0:10RPunto -b BL_inicio
    *Inyección rápida r2f3 10 !HCl 100 mM
    *Inyección rápida r2f4 10 !ácido fosfórico 100 mM
    *Inyección rápida r2f5 10 !ácido fosfórico 100 mM
    3:30RPunto BL_fin !baseline after regen.cycle
    FIN
    
```

DEFINIR BUCLE AG

```

LPARAM %apo %anr %aco %bnr %bco
10 TIEMPOS 1
! %apo %anr %aco %bnr %bco
r2a1 NT-proBNP 40nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a2 NT-proBNP 20nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a3 NT-proBNP 10nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a4 NT-proBNP 5nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a5 NT-proBNP 2.5nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a6 NT-proBNP 0nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2b1 HuSer1 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b2 HuSer2 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b3 HuSer3 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b4 HuSer4 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b5 HuSer5 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b6 HuSer6 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b7 HuSer7 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b8 HuSer8 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b9 HuSer9 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b10 HuSer10 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c1 HuSer11 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c2 HuSer12 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c3 HuSer13 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c4 HuSer14 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c5 HuSer15 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
    
```

Fig. 2c

```
r2c6 HuSer16 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c7 HuSer17 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c8 HuSer18 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c9 HuSer19 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c10 HuSer20 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
```

FIN

5 **DEFINIR BUCLE AB**

```
LPARAM %c1po %c1nr %c1co %c2po %c2nr %c2co %c3po %c3nr %c3co %c4po %c4nr %c4co
TIEMPOS 1
```

```
r1a1 AB1 500nM r1a2 AB2 500nM r1a3 AB3 500nM r1a4 AB4 500nM
r1b1 AB5 500nM r1b2 AB6 500nM r1b3 AB7 500nM r1b4 AB8 500nM
```

FIN

PRINCIPAL

```
Soporte 2 Termo_a
Soporte 2 Termo_c
```

10 detección 1,2,3,4

BUCLE AB ORDEN

```
APROG Regen
desbloquear
```

BUCLE AG ORDEN

```
APROG Sandwich %apo %anr %aco %bnr %bco %c1po %c1nr %c1co %c2po %c2nr %c2co
%c3po %c3nr %c3co %c4po %c4nr %c4co
```

BUCLE FINAL

BUCLE FINAL

```
APROG Regen
AGREGAR continua
FIN
```

15

Fig. 3

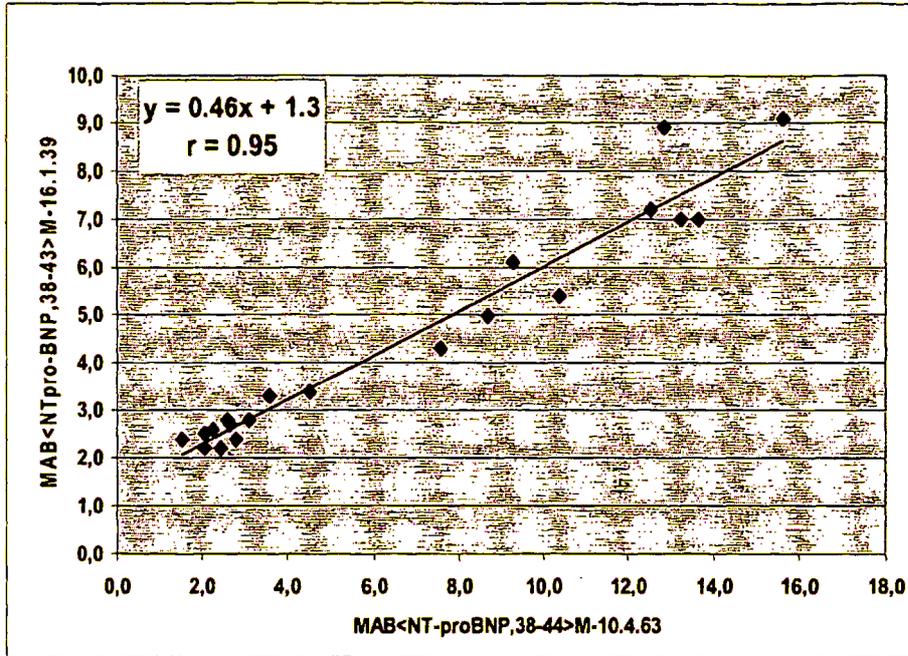


Fig. 4

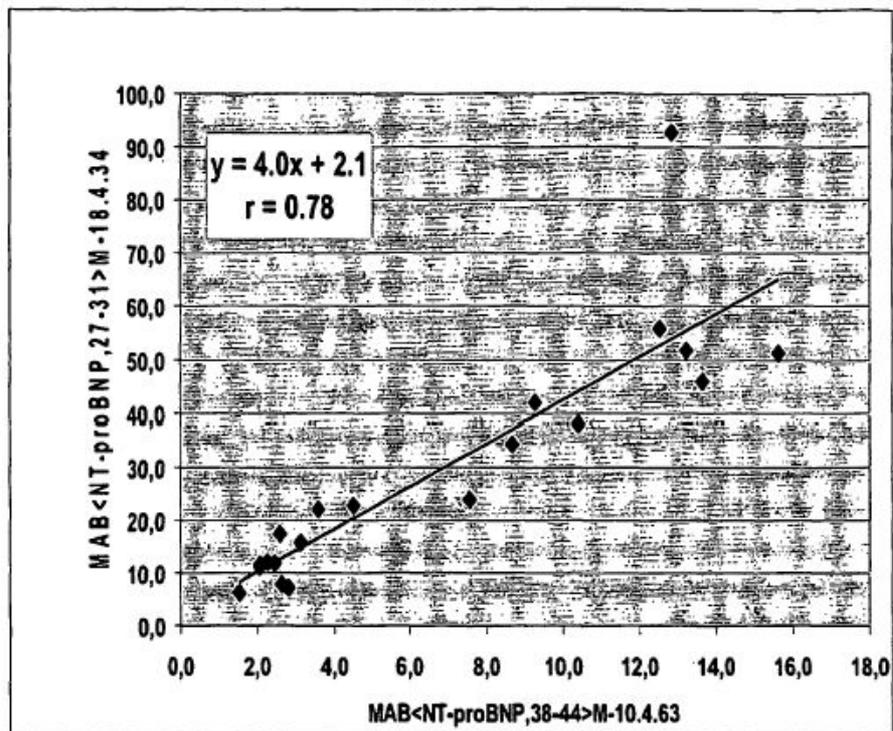


Fig. 5

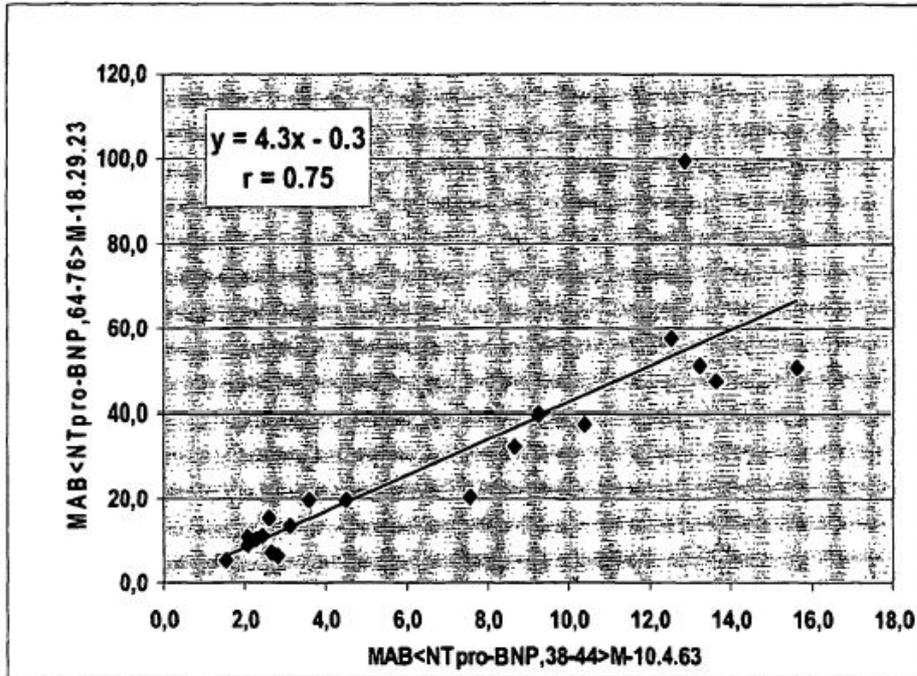


Fig. 6

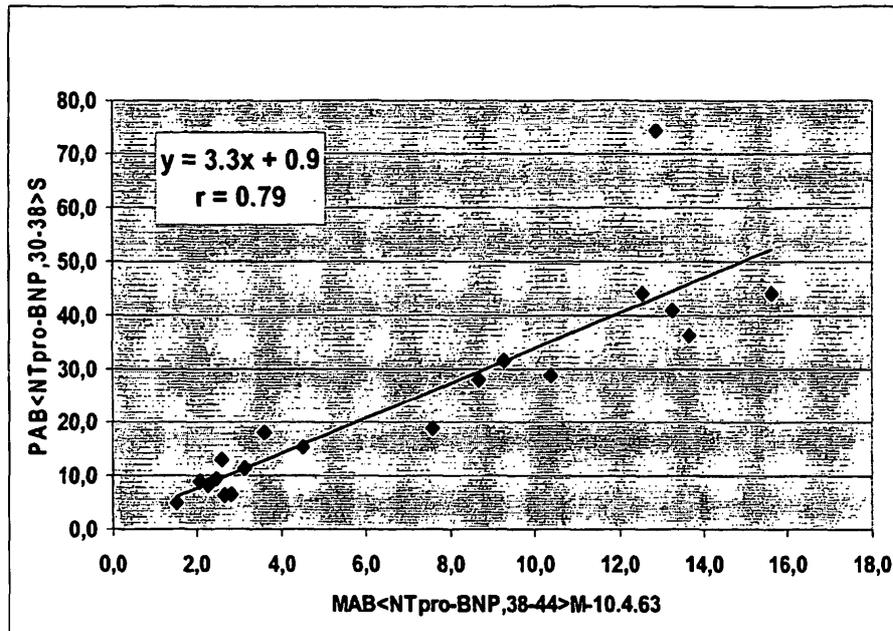


Fig. 7

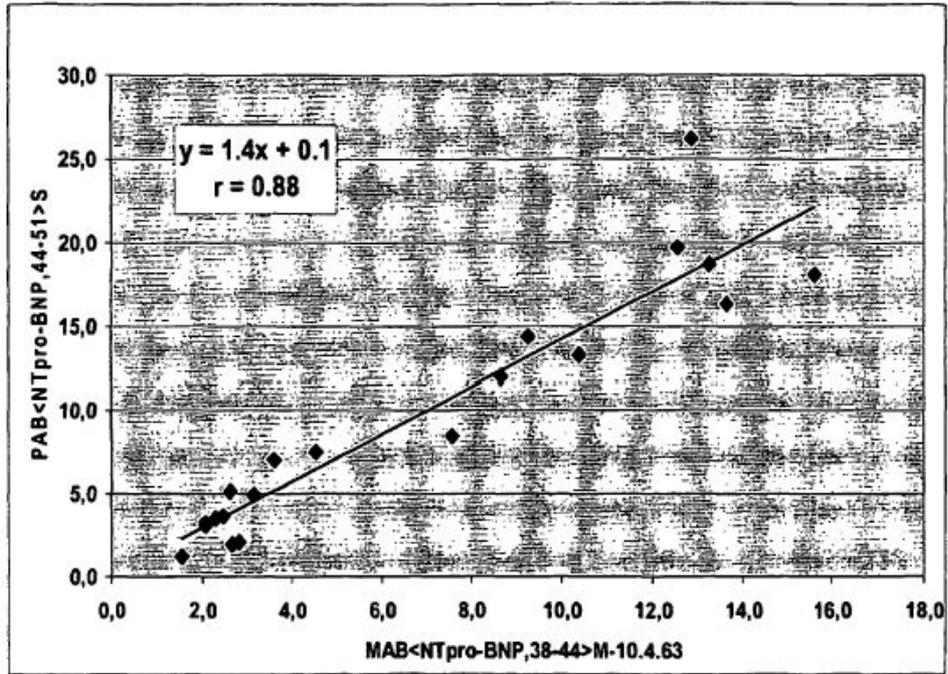


Fig. 8

