

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 741**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2008 E 08769335 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2150811**

54 Título: **Ensayo de péptido natriurético de tipo B humano que tiene una reducida reactividad cruzada con otras formas péptidicas**

30 Prioridad:

**08.05.2007 US 916718 P**

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

**24.04.2013**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)  
DEPARTMENT D377/AP6A-1 100 ABBOTT PARK  
ROAD  
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064-6008, US**

72 Inventor/es:

**MOORE, JEFFREY A. y  
SHIH, JESSIE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 401 741 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

Ensayo de péptido natriurético de tipo B humano que tiene una reducida reactividad cruzada con otras formas peptídicas

**Campo técnico**

La presente descripción se relaciona con ensayos para detectar y/o cuantificar la cantidad de péptido natriurético de tipo B humano en una muestra de ensayo. Específicamente, los ensayos de la presente descripción exhiben menos de aproximadamente un veinte por ciento (20%) de reactividad cruzada con cualquier péptido natriurético de tipo proB humano presente o contenido en una muestra de ensayo.

**Antecedentes**

El péptido natriurético atrial (de aquí en adelante "ANP"), el péptido natriurético de tipo B (de aquí en adelante "BNP"), el péptido natriurético de tipo C (de aquí en adelante "CNP") y el péptido natriurético de *Dendroaspis* (de aquí en adelante "DNP") son cada uno miembros de una familia de hormonas conocidas como "péptidos natriuréticos". El ANP y el BNP comparten un amplio espectro de propiedades biológicas y pertenecen al sistema natriurético cardíaco. Tanto el ANP como el BNP tienen su origen en las células del miocardio, mientras que el CNP tiene su origen en las células endoteliales. El DNP fue aislado del veneno de la serpiente mamba verde y posee similitud estructural con ANP, BNP y CNP.

El ANP es segregado por el corazón en las aurículas. El ANP tiene un anillo de 17 aminoácidos cerrado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína. Once de los diecisiete aminoácidos del anillo se conservan en ANP, BNP, CNP y DNP. Además de la estructura de anillo de 17 aminoácidos, el ANP tiene una cola amino-terminal de 6 aminoácidos y una cola carboxi-terminal de 5 aminoácidos. El ANP se produce como una forma pro-ANP de 126 aminoácidos que constituye la forma principal de almacenamiento del ANP. Tras escisión proteolítica entre los aminoácidos 98 y 99, el péptido maduro de 28 aminoácidos ANP se encuentra en el plasma del seno coronario (véase Yandle, J. *Internal Med.*, 235: 561-576 (1994)).

El BNP recibió su nombre por ser aislado por primera vez del cerebro porcino, por lo que, inicialmente, "BNP" significaba "péptido natriurético cerebral". Sin embargo, dado que se vio que el BNP pertenecía al sistema natriurético cardíaco, se cambió la palabra "cerebral" a "de tipo B". Por lo tanto, "BNP" se refiere ahora a "péptido natriurético de tipo B". En humanos, el BNP es segregado por el corazón a través del seno coronario, predominantemente desde los ventrículos cardíacos. El precursor del pre-propéptido del BNP humano (de aquí en adelante "pre-proBNP humano") tiene una longitud de 134 aminoácidos (SEC ID N° 1) e incluye un corto péptido señal, que se escinde enzimáticamente para liberar el propéptido humano de BNP (de aquí en adelante "proBNP humano"), que tiene una longitud de 108 aminoácidos (SEC ID N° 2). El proBNP humano se escinde además en un propéptido N-terminal del BNP humano (de aquí en adelante "proBNP-NT humano"), que tiene una longitud de 76 aminoácidos (SEC ID N° 3) y la hormona activa, el BNP humano (de aquí en adelante "hBNP" o "hBNP-32"), que tiene una longitud de 32 aminoácidos (SEC ID N° 4). Se ha sugerido que el proBNP-NT humano, el hBNP-32 y el proBNP humano pueden circular cada uno en el plasma humano (véanse Tateyama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 : 760-7 (1992); Hunt *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 1175-83 (1995)).

El CNP fue por primera vez encontrado en el cerebro; sin embargo, se origina en su mayoría en las células endoteliales y renales. Está ampliamente distribuido en la vasculatura, el cerebro, el hueso y el endotelio. Hay poca presencia, de haberla, de CNP en el corazón. El Pro-CNP es un péptido de 103 aminoácidos que se procesa para dar o bien CNP-53 (aminoácidos 51 a 103) o bien CNP-22 (aminoácidos 82 a 103), que son los péptidos activos. Como el ANP, el CNP tiene un anillo de 17 aminoácidos cerrado por un enlace disulfuro entre residuos de cisteína. Además de esta estructura de anillo de 17 aminoácidos, el CNP-22 tiene una cola amino-terminal de 5 aminoácidos y no contiene cola carboxi-terminal. El CNP-53 es idéntico al CNP-22, excepto por una extensión de 31 aminoácidos en el extremo amino-terminal.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el DNP fue aislado del veneno de la serpiente mamba verde. La forma madura del DNP está constituida por 38 aminoácidos. Se ha descrito inmunorreactividad de tipo DNP (DNP-LI) en el plasma humano y se ha visto que la concentración plasmática de DNP-LI está elevada en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (véase Cataliotti *et al.*, *Mayo Clin. Proc.*, 76: 111-1119 (2001)). Adicionalmente, se sabe también que la infusión de DNP sintético da lugar a natriuresis y diuresis marcadas en asociación con un aumento en plasma y orina de monofosfato cíclico de guanosina. *Id.*

En humanos, la enfermedad cardíaca puede estimular la secreción de ANP y BNP. De hecho, la secreción de ANP y BNP en humanos refleja típicamente un cambio en la función cardíaca. Específicamente, la secreción de ANP típicamente se acelera cuando la aurícula sufre una carga, mientras que la biosíntesis y secreción de BNP se estimulan cuando el ventrículo sufre una carga. Por lo tanto, tanto el ANP como el BNP son útiles como indicadores en el diagnóstico de la enfermedad cardíaca. Sin embargo, a pesar de esto y a lo largo del tiempo, se ha reconocido al BNP como un indicador de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad cardíaca, más que el ANP. Por ejemplo, la

concentración en sangre del BNP es sólo 1/6 de la del ANP en un sujeto normal, pero se vuelve mayor que la del ANP en pacientes con insuficiencia cardíaca. Más aún, la concentración en sangre del BNP aumenta en el caso de la insuficiencia cardíaca como la del ANP, y la concentración en plasma del BNP con frecuencia supera la del ANP, reflejando así con mayor precisión la gravedad de la disfunción cardíaca. Más aún, el nivel de BNP en pacientes con insuficiencia cardíaca aumenta a veces en múltiplos de varias decenas a varias centenas con respecto al de sujetos normales sanos.

Se sabe que el proBNP humano, el proBNP-NT humano y el hBNP pueden circular y pueden ser detectados en muestras de ensayo de pacientes que sufren de enfermedad cardiovascular, particularmente de insuficiencia cardíaca. Tanto el hBNP como el proBNP-NT humano son usados con frecuencia como marcadores para detectar la insuficiencia cardíaca y para valorar su riesgo en los pacientes. Sin embargo, no está clara la cantidad real de cada una de las formas individuales del BNP (es decir, proBNP humano, proBNP-NT humano y BNP humano) que circulan, debido a las reactividades cruzadas de los ensayos comerciales actuales para estas diversas formas (véase Liang F. *et al.*, J. American College of Cardiology, 49(10): 1071-1078 (2007)).

Adicionalmente, es sabido que el proBNP humano y el proBNP-NT humano pueden glicosilarse (véase Schellenberger, U. *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 451: 160-166 (2006)), y se han aislado estas formas glicosiladas de muestras humanas (véanse Hammerer-Lercher A. *et al.*, Clinical Chemistry, 54(5): 858-865 (2008), y Seferian, K. *et al.*, Clinical Chemistry, 54(5): 866-873(2008)). Existen siete sitios de posible glicosilación confinados en una región de 36 aminoácidos en la porción N-terminal del péptido (del aminoácido 36 al 71). Los anticuerpos generados para esta región pueden o no unirse a muestras que contengan el analito proBNP o proBNP-NT humano, dependiendo de: 1) el inmunógeno usado para producir el anticuerpo y 2) si el analito está o no glicosilado. Ensayos eventuales para el proBNP y el proBNP-NT humanos deberían usar anticuerpos que eviten estas regiones.

El artículo de Lam *et al.* en Journal of American College of Cardiology, vol. 49, nº 11, 2007, páginas 1193-1202, habla de la presencia de formas circulantes alternas de proBNP y BNP como evidenciadora de un procesado diverso de proBNP y BNP en la población general y concluye que las consecuencias fisiológicas de estas observaciones, tanto en términos de rendimiento del ensayo como de actividad del BNP endógeno merecen un mayor estudio.

En vista de lo cual, se necesitan en la técnica nuevos ensayos para cuantificar la cantidad de BNP humano, en particular ensayos que tengan una reducida reactividad cruzada con otras formas del péptido, y especialmente al entenderse cualquier significación clínica de la varianza en sus concentraciones circulantes individuales (v.g., frente a otras formas). La presente descripción busca proporcionar nuevos ensayos y métodos.

Los métodos pueden ser utilizados en ensayos cualitativos o cuantitativos para el BNP humano, incluyendo ensayos realizados para valorar la gravedad de la enfermedad cardiovascular, monitorizar la progresión de la enfermedad cardiovascular o valorar el riesgo de progresión de la enfermedad cardiovascular. Estos y otros objetos y ventajas, así como otras características adicionales, resultarán obvios gracias a la descripción detallada que aquí se proporciona.

## Resumen

La presente invención se relaciona con un método de determinación *in vitro* de la gravedad de la enfermedad cardiovascular en un sujeto según la reivindicación 1 adjunta.

La presente invención se relaciona también con un método de monitorización *in vitro* de la progresión de la enfermedad cardiovascular en un sujeto según la reivindicación 3 adjunta.

La presente invención se relaciona además con un método de identificación *in vitro* de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético para la enfermedad cardiovascular según la reivindicación 5 adjunta.

Además, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar si un sujeto ha experimentado una complicación cardiovascular como resultado de la administración a dicho sujeto de una o más composiciones farmacéuticas según la reivindicación 7 adjunta.

## Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra curvas de calibración típicas generadas usando calibradores basados en péptido hBNP y cuatro ensayos de BNP seleccionados según los inmunoensayos realizados de acuerdo con el Ejemplo 1. En esta Figura 1, -■- representa el conjugado micropartícula 3-631-436/106.3 AM1; -▲- representa el conjugado micropartícula 106.3 AM1/8.1; -◆- representa el conjugado micropartícula 3-631-436/8.1 y ° representa el conjugado micropartícula 106.3 AM1/M1.

La Figura 2 muestra el % medio de recuperación de péptido proBNP humano adicionado según los inmunoensayos

realizados de acuerdo con el Ejemplo 1. En esta Figura 2, la caja negra maciza representa el conjugado micropartícula 3-631-436/106.3 AM1; la caja cuadrículada representa el conjugado micropartícula 106.3AM1/8.1; la caja de puntos representa el conjugado micropartícula 3-631-436/8.1 y la caja achurada representa el conjugado micropartícula 106.3 AM1/M1.

5 La Figura 3 muestra una curva de calibración típica generada usando calibradores basados en el péptido proBNP humano según el inmunoensayo realizado de acuerdo con el Ejemplo 2. En esta Figura 3, -◇- representa el conjugado micropartícula 106.3 AM1/18 H5.

10 La Figura 4 muestra un gráfico de las concentraciones de hBNP frente a proBNP humano según el Ejemplo 4.

### Descripción detallada

15 La presente descripción se relaciona con inmunoensayos para cuantificar la cantidad de péptido natriurético de tipo B humano ("hBNP") presente en una muestra de ensayo que esté siendo estudiada por contener, o por ser sospechosa de contener, hBNP. Específicamente, los inmunoensayos de la presente descripción exhiben una reducida reactividad cruzada con cualquier propéptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano"). La presente descripción se relaciona con inmunoensayos para cuantificar la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo, donde los inmunoensayos exhiben una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano o con cualquier propéptido natriurético de tipo B N-terminal humano ("proBNP-NT humano").

20 En una realización, la presente invención se relaciona con un método de determinación *in vitro* de la gravedad o progresión de la enfermedad en un sujeto. En aún otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método de monitorización *in vitro* de la progresión de las enfermedades cardiovasculares en un sujeto. En otra realización, la presente invención se relaciona con un método de identificación *in vitro* de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético para la enfermedad cardiovascular. En otra realización, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar si un sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración a dicho sujeto de una o más composiciones farmacéuticas.

25 En una realización según la invención, se proporciona un método de determinación *in vitro* de la gravedad de la enfermedad cardiovascular en un sujeto, cuyo método *in vitro* comprende las etapas de:

- 30 (a) determinación de la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo según un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP;
- 35 (b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra mediante cualquier método apropiado (v.g., el método descrito en el Ejemplo 2);
- (c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra; y
- 40 (d) correlación de la razón molar o de la razón ponderal con la gravedad de la enfermedad cardiovascular en el sujeto, donde, si la razón es inferior a un nivel predeterminado, se determina que el sujeto tiene una mayor gravedad de la enfermedad cardiovascular, y, si la razón es superior a un nivel predeterminado, se determina que el sujeto tiene una menor gravedad de la enfermedad cardiovascular;

45 donde el inmunoensayo para la determinación de la cantidad de hBNP tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier propéptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") presente en la muestra de ensayo y comprende las etapas de:

- 50 (I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une al hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;
- 55 (II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado con un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y
- 60 (III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

65 donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada inferior a aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

En el método anterior, la enfermedad cardiovascular puede ser enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad

vascular periférica, hipertensión, infarto de miocardio o insuficiencia cardíaca, entre otros.

En aún otra realización según la invención, se proporciona un método de monitorización *in vitro* de la progresión de la enfermedad cardiovascular en un sujeto, cuyo método *in vitro* comprende las etapas de:

- (a) determinación de la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo según un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP;
- (b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra por cualquier método apropiado (*v.g.*, el método descrito en el Ejemplo 2);
- (c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra; y
- (d) correlación de la razón molar o de la razón ponderal con la progresión de la enfermedad en el sujeto, donde la razón es inferior en comparación con la de una muestra de ensayo anterior del sujeto con progresión y la razón está inalterada o es superior en comparación con la de una muestra de ensayo anterior del sujeto sin progresión o con mejoría de la enfermedad cardiovascular;

donde el inmunoensayo para la determinación de la cantidad de hBNP tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier propéptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") presente en la muestra de ensayo y comprende las etapas de:

- (I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;
- (II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une a hBNP y que ha sido conjugado con un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y
- (III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada inferior a aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

En el método anterior, se hace la monitorización eventualmente a continuación del tratamiento para la enfermedad cardiovascular, o con anterioridad al tratamiento (*v.g.*, cuando se hace la monitorización para ayudar a tomar la decisión terapéutica, tal como cuándo iniciar el tratamiento).

Un ejemplo de sujeto que exhibe uno o más indicios clínicos asociados a enfermedad cardiovascular es un sujeto que tiene una mutación en sus genes de corina o furina.

En aún otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para identificar a un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético para la enfermedad cardiovascular, cuyo método *in vitro* comprende las etapas de:

- (a) determinación de la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo de un sujeto que exhibe uno o más indicios clínicos asociados a enfermedad cardiovascular, cuya determinación es llevada a cabo con un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP;
- (b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra por cualquier método apropiado (*v.g.*, el método descrito en el Ejemplo 2);
- (c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra;
- (d) determinación de si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (c) es superior o inferior a un nivel predeterminado; y
- (e) identificación de si el sujeto se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético en base a la determinación de la etapa (d), donde, si la razón es inferior en comparación con el nivel predeterminado, se identifica al sujeto como un sujeto que no se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético, y, además, donde, si la razón es superior a un nivel predeterminado, entonces se identifica al sujeto como un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético;

donde el inmunoensayo para determinar la cantidad de hBNP tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier propéptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") presente en la muestra de ensayo y comprende las

etapas de

(I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;

(II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une a hBNP y que ha sido conjugado con un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y

(III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada inferior a aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

Un ejemplo de un derivado de péptido natriurético humano que podría utilizarse para tratar a un sujeto es la nesiritida.

En aún otra realización según la invención, se proporciona un método *in vitro* para determinar si un sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración a dicho sujeto de una o más composiciones farmacéuticas, cuyo método *in vitro* comprende las etapas de:

(a) determinación de la cantidad de BNP humano en una muestra de ensayo antes de haber administrado al sujeto una o más composiciones farmacéuticas con un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP presente en una muestra de ensayo;

(b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra por cualquier método apropiado (v.g., el método descrito en el Ejemplo 2);

(c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra;

(d) determinación de la cantidad de BNP humano en una segunda muestra de ensayo del sujeto después de haber administrado al sujeto una o más composiciones farmacéuticas, cuya determinación es llevada a cabo con dicho inmunoensayo;

(e) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha segunda muestra de ensayo por cualquier método apropiado (v.g., el método descrito en el Ejemplo 2);

(f) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha segunda muestra de ensayo; y

(g) comparación de la razón molar o de la razón ponderal determinada en la etapa (c) con la razón molar o ponderal en la etapa (f), donde, si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (c) está inalterada cuando se compara con la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (f), entonces se determina que el sujeto no ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración de una o más composiciones farmacéuticas, y además donde, si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (c) está alterada (ya sea superior o inferior) cuando se compara con la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (f), entonces se determina que el sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración de una o más composiciones farmacéuticas;

donde el inmunoensayo para determinar la cantidad de hBNP tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier propéptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") presente en la muestra de ensayo y comprende las etapas de:

(I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;

(II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une a hBNP y que ha sido conjugado con un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; and

(III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo

de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

5 donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada inferior a aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

10 En una realización preferida, dicho inmunoensayo de los métodos anteriores incluye además eventualmente una etapa de lavado tras la etapa (a), la etapa (b) o la etapa (a) y la etapa (b).

Más específicamente, en el anterior inmunoensayo, el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada inferior a aproximadamente el 15% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo. Incluso más específicamente, en el anterior inmunoensayo, el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada inferior a aproximadamente el 10% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

Más aún, el anticuerpo de captura (*v.g.*, el primer anticuerpo de captura) y el anticuerpo de detección usados en los inmunoensayos de la presente descripción pueden tener una constante de disociación en equilibrio de entre aproximadamente  $2,5 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $5,0 \times 10^{-13}$  M, o de entre aproximadamente  $2,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-12}$  M. El anticuerpo de captura (*v.g.*, el primer anticuerpo de captura) y el anticuerpo de detección pueden ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humano, un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo parcialmente humanizado, un anticuerpo animal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un Fv de una sola cadena, un anticuerpo de una sola cadena, un anticuerpo de un solo dominio, un fragmento Fab, un fragmento  $F(ab')_2$ , un Fv unido a disulfuro, un anticuerpo antiidiotípico o un fragmento de unión a epitopo funcionalmente activo de los mismos. Como ejemplos de anticuerpos que pueden ser utilizados como primer anticuerpo de captura, se incluyen, aunque sin limitación, 106.3, BC203, M1, Clone 3 (3-631-436), AM1, AM5, AM8, 8.1 y 201.3. Como ejemplos de anticuerpos que pueden ser utilizados como primer anticuerpo de detección, se incluyen, aunque sin limitación, 106.3, BC203, M1, Clone 3 (3-631-436), AM1, AM5, AM8, 8.1 y 201.3. Preferiblemente, el anticuerpo de captura es Clone 3 (3-631-436). Preferiblemente, el anticuerpo de detección es AM1 ó 8.1.

#### A. Definiciones

35 Tal como se utilizan aquí, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente en sentido contrario. Para recitar los rangos numéricos aquí dados, se contempla explícitamente cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el rango 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y, para el rango 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

40 a) Anticuerpo

Tal como se utilizan aquí, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), anticuerpos animales (en un aspecto, un ave (por ejemplo, un pato o un ganso), en otro aspecto, un tiburón o una ballena y en aún otro aspecto, un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un cobaya, un gato, un perro, una rata, un ratón, etc.) y un primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomolgo, un chimpancé, etc.)), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, Fv de una sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos de un solo dominio, fragmentos Fab, fragmentos  $F(ab')$ , fragmentos Fab", Fv unidos a disulfuro (sdFv) y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos de la presente descripción), y fragmentos de unión a epitopos funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulinas, a saber, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulinas pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase.

b) 8.1

60 Tal como se utiliza aquí, "8.1" se refiere a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma 8.1, que fue depositada en la American Type Culture Collection (A.T.C.C.) el 21 de Febrero de 1996 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. HB-12056. 8.1, y se describen métodos para preparar 8.1 en la Patente EE.UU. N° 6.162.902. 8.1 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 26-32 en hBNP.

65 c) 106.3

Tal como se utiliza aquí, "106.3" se refiere a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma 106.3, que fue depositada en la A.T.C.C. el 14 de Febrero de 1996 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. HB-12044. Se describen 106.3 y métodos para preparar 106.3 en la Patente EE.UU. N° 6.162.902. 106.3 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 5-13 en hBNP. Se han descrito dos diferentes constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) para 106.3, a saber, una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente  $0,32 \times 10^{-9}$  M y una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-9}$  M.

d) 201.3

Tal como se utiliza aquí, "201.3" se refiere a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma 201.3, que fue depositada en la A.T.C.C. el 14 de Febrero de 1996 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. HB-12045. Se describen 201.3 y métodos para preparar 201.3 en la Patente EE.UU. N° 6.162.902. 201.3 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 1-10 en hBNP.

e) AM1

Tal como se utilizan aquí, "AM1" o "106.3 AM1", "AM 1 106.3" o "106.3 L1 B24/H2 288" se refieren a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma 106.3 L1 B24/H2 288, que fue depositada en la A.T.C.C. el 20 de Septiembre de 2005 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. PTA-6987. Se describen AM1 y métodos para preparar AM1 en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 1/595.625, depositada el 9 de Noviembre de 2006. AM1 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 5-13 en hBNP. Se han descrito dos diferentes constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) para AM1, a saber, una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente  $0,14 \times 10^{-9}$  M y una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente  $1,9 \times 10^{-12}$  M.

f) AM5

Tal como se utiliza aquí, "AM5" se refiere a un anticuerpo o a derivados del mismo producidos por la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) AM5 (también conocida como BNP3-631-436AMSCHO893-214), que fue depositada en la A.T.C.C. el 24 de Abril de 2007 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. PTA-8369. Se describen AM5 y métodos para preparar AM5 en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 11/745,963, depositada el 8 de Mayo de 2007. La constante de disociación en equilibrio de AM5 es de aproximadamente  $1,4 \times 10^{-10}$  M. AM5 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 13-18 en hBNP.

g) AM8

Tal como se utiliza aquí, "AM8" se refiere a un anticuerpo o a derivados del mismo producidos por la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) AM8 (también conocida como BNP3-631-436AM8CH0974-211), que fue depositada en la A.T.C.C. el 24 de Abril de 2007 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. PTA-8368. Se describen AM8 y métodos para preparar AM8 en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 11/745.963, depositada el 8 de Mayo de 2007. La constante de disociación en equilibrio de AM8 es de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-10}$  M. AM8 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 13-18 en hBNP.

## h) BC203

Tal como se utiliza aquí, "BC203" se refiere a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma BC203, que fue depositada en el Fermentation Research Institute en 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, el 20 de Agosto de 1991 y a la que se asignó el N° de Acceso FERM BP-3515. Se describen BC203 y métodos para preparar BC203 en la Patente EE.UU. N° 6.677.124. BC203 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 26-32 en hBNP. Se han descrito dos diferentes constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) para BC203, a saber, una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente  $3,1 \times 10^{-8}$  M y una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente  $1,3 \times 10^{-9}$  M.

## i) Clone 3 o BNP 3-631-436

"Clone 3", "BNP 3-631-436 ms," "3-631-436" o "anticuerpo 3-631-436", tal como se utilizan aquí indistintamente, se refieren cada uno a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma 3-631-436, que fue depositada en la A.T.C.C. el 21 de Diciembre de 2004 y a la que se asignó el N° de Acceso A.T.C.C. PTA-6476. Se describen Clone 3 y métodos para preparar Clone 3 en la Publicación de Patente EE.UU. 2006/0183154, publicada el 17 de Agosto de 2006. Clone 3 se une a un epitopo que comprende los residuos de aminoácido 13-18 en hBNP. La constante de disociación en equilibrio de Clone 3 es de aproximadamente  $3,7 \times 10^{-10}$  M.

## j) M1

Tal como se utiliza aquí, "M1" se refiere a un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma M 1, que está comercializado por Strategic Diagnostics, Newark, Delaware (Número de Catálogo B910SMD01-D0). M1 se une al extremo carboxi (C) de hBNP. La constante de disociación en equilibrio dada de M1 es de aproximadamente  $1,7 \times 10^{-7}$  M.

## k) Velocidad de asociación

Tal como se utilizan aquí indistintamente, los términos "velocidad de asociación", " $k_{on}$ " o " $k_a$ " se refieren al valor que indica la fuerza (grado) de unión de un anticuerpo a su antígeno diana o la velocidad de formación de complejo entre mAb y antígeno, como se muestra mediante:



Los métodos para la determinación de las constantes de asociación ( $k_a$ ) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular) (v.g., instrumento de BIAcore International AB, una compañía sanitaria GE, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, se puede usar también un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), de Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

## l) Complicación cardiovascular

Tal como se utilizan aquí indistintamente, las expresiones "complicación cardiovascular" o "que sufre de una complicación cardiovascular" se refieren a cualquier enfermedad o acontecimiento cardiovascular. En la medida en que una enfermedad o acontecimiento cardiovascular cause una complicación secundaria (v.g., congestión pulmonar o pulmón congestivo), también se considera que dicha complicación secundaria es abarcada por la expresión "complicación cardiovascular". Una complicación cardiovascular puede estar "compensada" (v.g., significando compensada que la necesidad regular de oxígeno del organismo del sujeto puede aún ser satisfecha) o "descompensada" (v.g., significando descompensada que la necesidad regular de oxígeno del organismo del sujeto no está siendo satisfecha actualmente). Las expresiones "complicación cardiovascular" o "que sufre de una complicación cardiovascular" también incluyen el deterioro de una complicación cardiovascular preexistente.

## m) Enfermedad cardiovascular

Tal como se utiliza aquí, la expresión "enfermedad cardiovascular" se refiere a diversas enfermedades, trastornos o condiciones clínicas que impliquen al corazón, a los vasos sanguíneos o a la circulación. Las enfermedades, trastornos o condiciones pueden deberse a una alteración aterosclerótica de las arterias coronarias, cerebrales o periféricas. La enfermedad cardiovascular incluye, aunque sin limitación, la enfermedad de las arterias coronarias, la enfermedad vascular periférica, la hipertensión, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca, etc. Por ejemplo, en la insuficiencia cardíaca, "mayor gravedad" de la enfermedad cardiovascular se refiere al empeoramiento de la enfermedad indicado por un aumento en la clasificación NYHA a, por ejemplo, la Clase III o la Clase IV, y "menor gravedad" de la enfermedad cardiovascular se refiere a una mejoría de la enfermedad indicada por una reducción en la clasificación NYHA de, por ejemplo, la Clase III o IV a la Clase II o I.

## n) Indicios clínicos

Tal como se utiliza aquí, la expresión "indicios clínicos" se refiere a ensayos, métodos de ensayo (tales como la

imagen), estándares (tales como la clasificación de The New York Heart Association (NYHA)), medios biofísicos (tales como la concentración de LDL, la concentración de HDL, la concentración de triglicéridos, la presión sanguínea, el índice de masa corporal, la circunferencia de la cintura, el ritmo cardíaco, la concentración de insulina en ayunas, la concentración de glucosa en ayunas, el estado diabético) y otros parámetros biométricos (tales como, aunque sin limitación, la raza, el sexo, la edad, el estatus de fumador de tabaco, la historia previa de enfermedad cardiovascular, la historia familiar de enfermedad cardiovascular, el uso de medicación para la presión sanguínea alta, etc.) que proporcionan un indicador de enfermedad cardiovascular.

#### o) Velocidad de disociación

Tal como se utilizan aquí indistintamente, los términos "velocidad de disociación", " $k_{off}$ " o " $k_d$ " se refieren al valor que indica la fuerza (grado) de disociación de un anticuerpo con respecto a su antígeno diana o la separación del complejo Ab-Ag a lo largo del tiempo en mAb libre y antígeno, como se muestra mediante:



Los métodos para determinar las constantes de disociación ( $k_d$ ) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un ensayo Biacore® (Suecia). Adicionalmente, se puede usar también un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), disponible de Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

#### p) Constante de disociación en equilibrio

Tal como se utilizan aquí indistintamente, los términos "constante de disociación en equilibrio" o " $K_D$ " se refieren al valor obtenido dividiendo la velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) por la velocidad de asociación ( $k_{on}$ ). La velocidad de asociación, la velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio son utilizadas para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno.

#### q) Epitopo

Tal como se utiliza aquí, el término "epitopo" o "epitopos" se refiere a sitios o fragmentos de un polipéptido o proteína que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un sujeto. Un epitopo que tiene actividad inmunogénica es un sitio o fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epitopo que tiene actividad antigénica es un sitio o fragmento de un polipéptido o proteína al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo, según se determina por cualquier método bien conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos.

#### r) Insuficiencia cardíaca

Tal como se utiliza aquí, la expresión "insuficiencia cardíaca" se refiere a una condición en la que el corazón no puede bombear la sangre eficientemente al resto del cuerpo. La insuficiencia cardíaca puede deberse a una lesión del corazón o a un estrechamiento de las arterias debido a infarto, cardiomiopatía (primaria o secundaria), hipertensión, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de las válvulas, defectos de nacimiento o infección. Se puede describir además la insuficiencia cardíaca como crónica, congestiva, aguda, descompensada, sistólica o diastólica. La clasificación de The New York Heart Association (NYHA) describe la gravedad de la enfermedad en base a la capacidad funcional del paciente; la clase NYHA puede progresar y/o regresar en base al tratamiento o la falta de respuesta al tratamiento.

#### s) Péptido natriurético cerebral humano

Tal como se utilizan aquí indistintamente, los términos "péptido natriurético cerebral humano", "BNP humano", "hBNP", "hBNP-32", "péptido hBNP", "polipéptido hBNP" o "péptido natriurético de tipo B" se refieren a una molécula de 32 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4. La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 está representada por los aminoácidos 77-108 de la secuencia de 108 aminoácidos del proBNP humano (SEC ID N° 2).

#### t) Fragmento de hBNP

Tal como se utilizan aquí indistintamente, los términos "fragmento de hBNP" "fragmento de hBNP-32", "fragmento del péptido hBNP" o "fragmento del BNP humano" se refieren a un polipéptido que incluye al menos seis aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4. En un aspecto, un fragmento de hBNP o un fragmento del péptido hBNP se refiere a un péptido que incluye al menos diez residuos de aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4, al menos quince residuos de aminoácidos contiguos de los aminoácidos de la SEC ID N° 4, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4, o al menos 30 residuos de aminoácidos contiguos de los aminoácidos de la SEC ID N° 4. Como ejemplos de fragmentos de hBNP o de fragmentos del péptido hBNP, se incluyen, aunque sin limitación, las secuencias de aminoácidos que contienen los residuos de aminoácidos 1-31, 1-30, 1-29, 1-28, 1-27, 1-26, 1-25, 1-24, 1-23, 1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-

18, 1-17, 1-16, 1-15, 2-32, 2-31, 2-30, 2-29, 2-28, 2-27, 2-26, 2-25, 2-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 3-32, 3-31, 3-30, 3-29, 3-28, 3-27, 3-26, 3-25, 3-24, 3-23, 3-32, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 4-32, 4-31, 4-30, 4-29, 4-28, 4-27, 4-26, 4-25, 4-24, 4-23, 4-22, 4-21, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 5-32, 5-31, 5-30, 5-29, 5-28, 5-27, 5-26, 5-25, 5-24, 5-23, 5-22, 5-21, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 6-32, 6-31, 6-30, 6-29, 6-28, 6-27, 6-26, 6-25, 6-24, 6-23, 6-22, 6-21, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 7-32, 7-31, 7-30, 7-29, 7-28, 7-27, 7-26, 7-25, 7-24, 7-23, 7-22, 7-21, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 8-32, 8-31, 8-30, 8-29, 8-28, 8-27, 8-26, 8-25, 8-24, 8-23, 8-22, 8-21, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 9-32, 9-31, 9-30, 9-29, 9-28, 9-27, 9-26, 9-25, 9-24, 9-23, 9-22, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 10-32, 10-31, 10-30, 10-29, 10-28, 10-27, 10-26, 10-25, 10-24, 10-23, 10-22, 10-21, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 11-32, 11-31, 11-30, 11-29, 11-28, 11-27, 11-26, 11-25, 11-24, 11-23, 11-22, 11-21, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17 ó 11-16 de la SEC ID N° 4.

#### u) Análogo del péptido natriurético humano

Tal como se utiliza aquí, la expresión "análogo del péptido natriurético humano" se refiere a un análogo biológicamente activo de un péptido natriurético humano (v.g., BNP humano). Por ejemplo, un análogo biológicamente activo de un péptido natriurético humano puede ser un péptido natriurético humano con truncaciones, deleciones, inserciones, substituciones, reemplazos, extensiones de cadena lateral y proteínas de fusión, o combinaciones de los anteriores, que no eliminen la actividad biológica del compuesto original. Se pueden obtener análogos de péptido natriurético humano por diversos medios. Por ejemplo, se pueden substituir con ciertos aminoácidos otros aminoácidos en la estructura del péptido natriurético nativo sin eliminar la capacidad de unión interactiva. Se describen ejemplos de análogos de péptido natriurético humano y métodos para preparar dichos análogos en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 2006/0172933.

#### v) Conjugado de péptido natriurético humano

Tal como se utiliza aquí, la expresión "conjugado de péptido natriurético humano" se refiere a péptido natriurético humano o fragmento de péptido natriurético humano que incluye al menos un resto modificante o al menos una entidad reactiva unida al mismo. Los restos modificantes son restos que modifican a un péptido natriurético humano o a un fragmento de péptido natriurético humano (v.g., hBNP o fragmento de hBNP). Como ejemplos de restos modificantes, se incluyen, aunque sin limitación, restos que afectan a la estabilidad, solubilidad y/o actividad biológica (v.g., polímeros u oligómeros hidrofílicos, polímeros u oligómeros anfílicos y polímeros u oligómeros lipofílicos), restos hidrofílicos, restos de polietilenglicol, restos hidrosolubles biocompatibles, restos policatiónicos, restos anfílicos, restos modificadores de polietilenglicol/alquilo, etc. (cada uno de los cuales está descrito en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 2006/0172933).

Los péptidos natriuréticos humanos o fragmentos de péptidos natriuréticos humanos pueden ser químicamente modificados (por enlaces covalentes) por copulación a una entidad reactiva, como se describe en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 2004/0266673. La entidad reactiva es capaz de formar un enlace covalente con un componente de la sangre, preferiblemente una proteína de la sangre. El enlace covalente se forma generalmente entre la entidad reactiva y un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo tiol del componente de la sangre. El grupo amino puede formar un enlace covalente con entidades reactivas como carboxi, fosforilo o acilo; el grupo hidroxilo forma preferiblemente un enlace covalente con entidades reactivas como ésteres activados; y el grupo tiol forma preferiblemente un enlace covalente con entidades reactivas como ésteres o anhídridos mixtos. Los componentes de la sangre preferidos son componentes de la sangre móviles, como seroalbúmina, inmunoglobulinas o sus combinaciones, y la entidad reactiva preferida incluye anhídridos, tales como maleimida o grupos que contienen maleimida.

Los métodos para conjugar un resto modificante a moléculas base, tales como péptidos natriuréticos humanos (v.g., BNP humano) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen estrategias para conjugar un resto modificante a un péptido natriurético humano en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 2006/0172933. Se describen métodos para modificar químicamente péptidos natriuréticos humanos con una entidad reactiva en la Solicitud de Patente EE.UU. N° 2004/0266673.

w) Derivado de péptido natriurético humano

5 Tal como se utiliza aquí, la expresión "derivado natriurético humano" se refiere a un análogo de péptido natriurético humano, un conjugado de péptido natriurético humano o una forma recombinante de un péptido natriurético humano (v.g., una forma recombinante del BNP humano (SEC ID N° 4) (v.g., nesiritida)).

x) Reactivo de inmunodiagnóstico

10 Tal como se utiliza aquí, el término "reactivo de inmunodiagnóstico" se refiere a uno o más anticuerpos que se unen específicamente a una región del hBNP.

y) Composición farmacéutica

15 Tal como se utiliza aquí, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier agente o fármaco, ya sea una molécula pequeña (v.g., un fármaco que contenga un principio activo) o un agente biológico, que pueda ser utilizado para tratar a un sujeto que sufre de una enfermedad o condición que requiera tratamiento. Como ejemplos de composiciones farmacéuticas, se incluyen, aunque sin limitación, antineoplásicos (quimioterapéuticos), antidepresivos (v.g., antidepresivos tricíclicos), fármacos para la esclerosis múltiple, anestésicos, interferones, hormonas, fármacos antivíricos para el VIH, etc., así como cualquier combinación de los mismos. En general, una composición farmacéutica puede ser una que se sepa o sospeche que tiene un impacto sobre el sistema cardiovascular, o una que inesperada o sorprendentemente tenga un impacto sobre el sistema cardiovascular.

z) Prepropéptido precursor del BNP humano

25 Tal como se utiliza aquí, el término "prepropéptido precursor del BNP humano" o "preproBNP humano" se refiere a una molécula de 134 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1.

aa) Propéptido del BNP humano

30 Tal como se utiliza aquí, el término "propéptido del BNP humano" o "proBNP humano" se refiere a una molécula de 108 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2. El proBNP humano deriva del preproBNP humano.

bb) Propéptido N-terminal del BNP humano

35 Tal como se utilizan aquí, los términos "propéptido N-terminal del BNP humano," "propéptido natriurético de tipo B-NT humano" o "proBNP-NT humano" se refieren a una molécula de 76 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3. El proBNP-NT humano deriva del proBNP humano (SEC ID N° 2).

40 cc) Sujeto

45 Tal como se utilizan aquí, los términos "sujeto" y "paciente" son usados indistintamente, aunque un sujeto de la presente descripción no tiene necesariamente por qué estar o haber estado bajo tratamiento médico en el momento del inmunoensayo. Tal como se utilizan aquí, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, en un aspecto un ave (por ejemplo, un pato o un ganso), en otro aspecto un tiburón o una ballena, o en otro aspecto más un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un cobaya, un gato, un perro, una rata y un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomolgo, un chimpancé y un humano). Preferiblemente, el sujeto es un humano.

50 dd) Muestra de ensayo

55 Tal como se utiliza aquí, el término "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica derivada de tejidos, suero, plasma, sangre entera, linfa, líquido cerebrospinal, orina u otros fluidos corporales de un sujeto que esté siendo estudiado en cuanto al hBNP y/o que pueda ser sospechoso de contenerlo. La muestra de ensayo puede ser preparada utilizando técnicas rutinarias conocidas para los expertos en este campo.

ee) Retrolectura

60 El término "retrolectura" se refiere a la concentración de un analito dado (v.g., proBNP) leída a partir de una curva de calibración (v.g., una curva de calibración de BNP). De manera óptima, cuando el analito no es idéntico al calibrador (v.g., analito proBNP y calibrador BNP), se corrige la retrolectura para la diferencia de peso molecular.

## ff) Reactividad cruzada reducida

El término "reactividad cruzada reducida", tal como se utiliza aquí, se refiere a un inmunoensayo para el BNP humano en una muestra de ensayo que emplea uno o más anticuerpos que, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reducción en cualquier unión al proBNP o al proBNP-NT contenido en la muestra de ensayo, en comparación con cualquier otro (v.g., al menos uno, eventualmente al menos dos) ensayo para el BNP humano y/o estudio de adición de BNP humano, como es sabido por un experto en la técnica. La reducción puede variar de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 20%, eventualmente de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 20%, de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 15%, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 15%, de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 10% o de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 10%.

## gg) Nivel predeterminado

Tal como se utiliza aquí, el término "nivel predeterminado" se refiere generalmente a un valor de corte de ensayo que se usa para valorar los resultados diagnósticos por comparación de los resultados de ensayo con el nivel predeterminado, y donde ya se ha ligado o asociado el nivel predeterminado a diversos parámetros clínicos (v.g., gravedad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejoría, etc.). La presente descripción proporciona ejemplos de niveles predeterminados y describe la relación o asociación inicial de dichos niveles con parámetros clínicos para inmunoensayos ejemplares como aquí se describe. Sin embargo, es bien sabido que los valores de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (v.g., anticuerpos empleados, etc.). Está además dentro de los conocimientos ordinarios de un experto en la técnica adaptar la descripción que aquí se da a otros inmunoensayos para obtener valores de corte específicos de inmunoensayo para esos otros inmunoensayos en base a esta descripción. Aunque el valor preciso del nivel predeterminado (corte) puede variar entre ensayos, deberían ser generalmente aplicables las correlaciones aquí descritas.

**B. Inmunoensayos**

Tal como se menciona aquí brevemente, la presente descripción se relaciona con inmunoensayos que pueden ser utilizados para la detección cualitativa y/o la cuantificación de hBNP o un fragmento de hBNP en una muestra de ensayo. Los inmunoensayos aquí descritos exhiben una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano o proBNP-NT humano que pueda estar contenido en la muestra de ensayo.

Los inmunoensayos de la presente descripción pueden ser realizados usando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, aunque sin limitación, un formato en sándwich.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar hBNP o un fragmento de hBNP en una muestra de ensayo. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a determinados epitopos del hBNP o del fragmento de hBNP para formar un complejo inmune, al que se hace referencia como un "sándwich". En general, en los inmunoensayos se pueden usar uno o más anticuerpos para capturar el hBNP o fragmento de hBNP en la muestra de ensayo (con frecuencia se hace referencia a estos anticuerpos como un anticuerpo "de captura" o anticuerpos "de captura") y se pueden usar uno o más anticuerpos para unir un marcaje detectable (a saber, cuantificable) al sándwich (con frecuencia se hace referencia a estos anticuerpos como el "anticuerpo de detección", los "anticuerpos de detección", un "conjugado" o "conjugados").

Los inventores han descubierto que se pueden realizar excelentes inmunoensayos, en particular ensayos en sándwich, utilizando ciertas combinaciones de anticuerpos como anticuerpos de captura y de detección. Más específicamente, los anticuerpos utilizados en realizaciones particulares de la presente descripción como anticuerpos de captura y de detección tienen cada uno una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) que varía entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $5,0 \times 10^{-13}$  M o entre aproximadamente  $2,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-12}$  M. Como ejemplos de anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) dentro de los rangos antes descritos y que pueden ser utilizados como anticuerpos de captura y de detección en los inmunoensayos de la presente descripción, se incluyen, aunque sin limitación, 106.3, BC203, Clone 3, M1, AM1, AM5, 201.3, AM8 o 8.1.

Ciertas combinaciones de anticuerpos de captura y de anticuerpos conjugados no resultan preferidas para uso conjunto en un ensayo en sándwich como aquí se describe, ya que comparten los mismos epitopos o epitopos solapantes. Se muestran a continuación en la Tabla A grupos de anticuerpos con los mismos epitopos o con epitopos solapantes:

Tabla A

Grupo	Anticuerpos
A	Clon 3, AM5 o AM8
B	106.3, AM 1 ó 201.3
C	BC203, M1 ó 8.1

5 En general, los anticuerpos de grupos diferentes (*v.g.*, arbitrariamente designados como "A", "B" o "C") se emparejarán entre sí. Por ejemplo, en general, un anticuerpo del Grupo A se emparejará con un anticuerpo del Grupo B. En algunos casos y formatos de ensayo, sin embargo, es posible usar para la formación del sándwich dos anticuerpos que tengan epitopos solapantes o contiguos. En otras palabras, la Tabla A es meramente ejemplar, sin estar destinada a limitar en términos de emparejamientos de anticuerpos.

10 Los inmunoensayos realizados como se describe aquí que emplean al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección que tienen cada uno una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) que varía entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $5,0 \times 10^{-13}$  M o entre aproximadamente  $2,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-12}$  M, y cuando dichos al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección son usados conjuntamente, exhiben una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano que pueda estar presente en la muestra de ensayo. El inmunoensayo exhibe una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano que pueda estar presente en la muestra de ensayo. Más preferiblemente, el inmunoensayo exhibe una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 19%, menos de aproximadamente el 18%, menos de aproximadamente el 17%, menos de aproximadamente el 16%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 14%, menos de aproximadamente el 13%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 11%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% (*v.g.*, tal como aproximadamente el 0,1%) con cualquier proBNP humano que pueda estar presente en la muestra de ensayo.

30 En otra realización de la descripción, los inmunoensayos realizados como se describe aquí que emplean al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección que tienen cada uno una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) que varía entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $5,0 \times 10^{-13}$  M o entre aproximadamente  $2,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-12}$  M exhiben una reducida reactividad cruzada con un proBNP humano o proBNP-NT humano que pueda estar presente en la muestra de ensayo. Preferiblemente, el inmunoensayo exhibe una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano o proBNP-NT humano que pueda estar presente en la muestra de ensayo.

35 El inmunoensayo exhibe una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 19%, menos de aproximadamente el 18%, menos de aproximadamente el 17%, menos de aproximadamente el 16%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 14%, menos de aproximadamente el 13%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 11%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% con cualquier proBNP humano o proBNP-NT humano que pueda estar presente en la muestra de ensayo.

45 Se puede poner en contacto la muestra de ensayo en estudio para (*v.g.*, que se sospecha que contiene) hBNP o un fragmento de hBNP con al menos un anticuerpo (o anticuerpos) de captura y al menos un anticuerpo (o anticuerpos) de detección simultánea o secuencialmente y en cualquier orden. Por ejemplo, se puede poner primeramente en contacto la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo de captura y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de detección. Alternativamente, se puede poner primeramente en contacto la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo de detección y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de captura. En aún otra alternativa, se puede poner en contacto la muestra de ensayo simultáneamente con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección.

55 En el formato de ensayo en sándwich, se pone en contacto primeramente una muestra de ensayo sospechosa de contener hBNP o un fragmento de hBNP con el al menos un primer anticuerpo de captura que tiene una constante de disociación en equilibrio que varía entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $5,0 \times 10^{-13}$  M o entre aproximadamente  $2,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-12}$  M en condiciones que permiten la formación de un complejo primer anticuerpo-hBNP. Si se usa más de un anticuerpo de captura, se forma un complejo primer anticuerpo de captura múltiple-hBNP. En un ensayo en sándwich, los anticuerpos, preferiblemente el al menos un anticuerpo de captura, son utilizados en cantidades en exceso molar con respecto a la cantidad máxima de hBNP o fragmento de hBNP esperada en la

muestra de ensayo. Por ejemplo, se pueden usar de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por ml de tampón (v.g., tampón de revestimiento de micropartículas).

5 Con anterioridad al contacto de la muestra de ensayo con el al menos un anticuerpo de captura (v.g., el primer anticuerpo de captura), el al menos un anticuerpo de captura puede unirse a un soporte sólido que facilita la separación del complejo primer anticuerpo-hBNP de la muestra de ensayo. Se puede usar cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, soportes sólidos hechos de materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o perlas. El anticuerpo (o anticuerpos) puede unirse al soporte sólido por adsorción, por unión covalente utilizando un agente de copulación química o por otros medios conocidos en la técnica, siempre que  
10 dicha unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse a hBNP o a un fragmento de hBNP. Alternativamente, el anticuerpo (o anticuerpos) puede unirse con micropartículas previamente revestidas con estreptavidina (por ejemplo, utilizando micropartículas revestidas con estreptavidina Power-Bind™-SA-MP, disponibles gracias a Seradyn, Indianápolis, Indiana). Alternativamente, el anticuerpo (o anticuerpos) puede unirse utilizando micropartículas previamente revestidas con anticuerpos monoclonales específicos anti-especie. Más aún,  
15 si es necesario, se puede derivatizar el soporte sólido para permitir la reactividad con diversos grupos funcionales sobre el anticuerpo. Dicha derivatización requiere el uso de determinados agentes copulantes, tales como, aunque sin limitación, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

20 Después de poner en contacto la muestra de ensayo que está siendo estudiada en cuanto al hBNP o un fragmento de hBNP y/o que es sospechosa de contenerlo con el al menos un anticuerpo de captura (v.g., el primer anticuerpo de captura), se incuba la mezcla para permitir la formación de un complejo primer anticuerpo (o anticuerpo múltiple)-hBNP. Se puede realizar la incubación a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C y durante un período de al menos  
25 aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 2-4 minutos. El inmunoensayo aquí descrito puede ser realizado en una etapa (lo que significa que se añaden la muestra de ensayo, al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección todos ellos secuencial o simultáneamente a un recipiente de reacción) o en más de una etapa, tal como en dos etapas, tres etapas, etc.

30 Tras la formación del complejo (primer/múltiple) anticuerpo de captura-hBNP, se pone luego en contacto el complejo con al menos un anticuerpo de detección (en condiciones que permiten la formación de un complejo (primer/múltiple) anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección). El al menos un anticuerpo de detección puede ser el segundo, tercer, cuarto, etc. anticuerpo usado en el inmunoensayo. Si se pone en contacto el complejo anticuerpo de captura-hBNP con más de un anticuerpo de detección, entonces se forma un complejo (primer/múltiple)  
35 anticuerpo de captura-hBNP-(múltiple) anticuerpo de detección. Como con el anticuerpo de captura (v.g., el primer anticuerpo de captura), cuando se pone en contacto el al menos un segundo (y subsecuentes) anticuerpo de detección con el complejo anticuerpo de captura-hBNP, se requiere un período de incubación en condiciones similares a las antes descritas para la formación del complejo (primer/múltiple) anticuerpo de captura-hBNP-(segundo/múltiple) anticuerpo de detección. Preferiblemente, al menos un anticuerpo de detección contiene un  
40 marcaje detectable. El marcaje detectable puede unirse al al menos un anticuerpo de detección (v.g., el segundo anticuerpo de detección) antes de, simultáneamente a, o después de, la formación del complejo (primer/múltiple) anticuerpo de captura-hBNP-(segundo/múltiple) anticuerpo de detección. Se puede usar cualquier marcaje detectable conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcaje detectable puede ser un marcaje radiactivo, tal como <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P o <sup>33</sup>P; un marcaje enzimático, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, glucosa 6-  
45 fosfato deshidrogenasa, etc.; un marcaje quimioluminiscente, tal como ésteres de acridinio, luminol, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc.; un marcaje fluorescente, tal como fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina o puntos cuánticos (selenuro de cadmio rematado con sulfuro de zinc); un marcaje termométrico; o un marcaje de reacción en  
50 cadena de inmunopolimerasa. Se encuentra una introducción a marcajes, procedimientos de marcaje y detección de marcajes en Polak y Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996), que es una combinación de manual y catálogo publicada por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón. Además, se puede usar más de un marcaje. Por ejemplo, se pueden usar conjugados dobles, cada uno de los cuales contiene diferentes marcajes. Por ejemplo, un  
55 anticuerpo conjugado puede contener biotina y el segundo conjugado puede ser un anticuerpo anti-biotina marcado con acridinio. Otras variaciones serán fácilmente reconocibles por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica.

60 El marcaje detectable puede unirse a los anticuerpos directamente o a través de un agente copulante. Un ejemplo de agente copulante que puede ser utilizado es EDAC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), comercializado por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Otros agentes copulantes utilizables son conocidos en la técnica. Los métodos de unión de un marcaje detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Adicionalmente, se pueden comprar o sintetizar muchos marcajes detectables que ya contengan grupos terminales que faciliten la copulación del marcaje detectable al anticuerpo, tales como éster activo de N10-(3-sulfopropil)-N-(3-carboxipropil)acridinio-9-carboxamida, también conocido como éster CPSP-acridinio, o éster activo de N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)acridinio-9-carboxamida, también conocido como éster SPSP-acridinio.  
65

El complejo (primer/múltiple) anticuerpo de captura-hBNP-(segundo/múltiple) anticuerpo de detección puede ser separado, aunque no tiene por qué, del resto de la muestra de ensayo antes de la cuantificación del marcaje. Por ejemplo, si el al menos un anticuerpo de captura (v.g., el primer anticuerpo de captura) está unido a un soporte sólido, tal como un pocillo o una perla, se puede conseguir la separación retirando el fluido (de la muestra de ensayo) del contacto con el soporte sólido. Alternativamente, si el al menos un primer anticuerpo de captura está unido a un soporte sólido, se puede poner éste en contacto simultáneamente con la muestra que contiene hBNP y el al menos un segundo anticuerpo de detección para formar un complejo primer (múltiple) anticuerpo-hBNP-segundo (múltiple) anticuerpo, retirando a continuación el fluido (muestra de ensayo) del contacto con el soporte sólido. Si el al menos un primer anticuerpo de captura no está unido a un soporte sólido, entonces el complejo (primer/múltiple) anticuerpo de captura-hBNP-(segundo/múltiple) anticuerpo de detección no tiene que ser retirado de la muestra de ensayo para cuantificación de la cantidad del marcaje.

Tras la formación del complejo anticuerpo de captura-hBNP-anticuerpo de detección macado (v.g., el complejo primer anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección), se cuantifica la cantidad de marcaje en el complejo utilizando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, si se usa un marcaje enzimático, el complejo marcado reacciona con un sustrato para el marcaje que da una reacción cuantificable, tal como el desarrollo de color. Si el marcaje es un marcaje radiactivo, se cuantifica el marcaje utilizando un contador de centelleo. Si el marcaje es un marcaje fluorescente, se cuantifica el marcaje estimulando el marcaje con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y detectando otro color (que se conoce como la "longitud de onda de emisión") que emite el marcaje en respuesta a la estimulación. Si el marcaje es un marcaje quimioluminiscente, se cuantifica el marcaje detectando la luz emitida visualmente o mediante el uso de luminómetros, película de rayos x, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez cuantificada la cantidad del marcaje en el complejo, se determina la concentración de hBNP o fragmento de hBNP en la muestra de ensayo utilizando una curva estándar generada usando diluciones seriadas de hBNP o fragmento de hBNP de concentración conocida. Aparte de utilizando diluciones seriadas de hBNP o fragmento de hBNP, se puede generar la curva estándar gravimétricamente, por espectroscopía de masas y por otras técnicas conocidas en este campo.

### C. Métodos de determinación de ciertas razones en una muestra de ensayo

La presente descripción se relaciona con métodos para determinar la razón molar o la razón ponderal de (a) la cantidad de hBNP con respecto a la cantidad de proBNP humano en una muestra de ensayo o (b) la cantidad de proBNP humano con respecto a hBNP en una muestra de ensayo. Específicamente, los métodos de la presente descripción incluyen la determinación de la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo. Se pueden usar cualesquiera métodos apropiados para determinar o cuantificar la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dicho método puede ser un inmunoensayo, tal como el inmunoensayo aquí descrito (v.g., en la Sección B anterior). Adicionalmente, los métodos de la presente descripción incluyen también la determinación o cuantificación de la cantidad de proBNP humano en una muestra de ensayo. Se pueden usar cualesquiera métodos apropiados para determinar o cuantificar la cantidad de proBNP humano en una muestra de ensayo. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dicho método puede ser un inmunoensayo, tal como el inmunoensayo aquí descrito (v.g., en la Sección B anterior). Alternativamente, se puede usar un método tal como el descrito en el Ejemplo 2. El orden en el que se determina o cuantifica la cantidad de hBNP o de proBNP humano en una muestra de ensayo no es crítico. La razón molar o la razón ponderal que puede ser determinada puede ser (i) la cantidad de hBNP con respecto a la cantidad de proBNP humano en dicha muestra o (ii) la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra. Preferiblemente, la razón molar o la razón ponderal que se determina es la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo.

La razón molar de proBNP humano/hBNP determinada según el método antes descrito puede variar de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 50,0. Preferiblemente, el rango es de aproximadamente 1,20 a aproximadamente 45,0. La razón ponderal de proBNP humano/hBNP determinada según el método antes descrito puede variar de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 150,0. Preferiblemente, el rango es de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 145,0. La razón molar de hBNP/proBNP humano determinada según el método antes descrito puede variar de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,72. La razón ponderal de hBNP/proBNP humano determinada según el método antes descrito puede variar de aproximadamente 0,007 a aproximadamente 0,21.

La razón molar o la razón ponderal determinada utilizando los métodos aquí descritos puede ser útil para proporcionar un indicador del estatus clínico (es decir, gravedad o progresión de la enfermedad) de un sujeto. Por ejemplo, se puede usar la razón molar o la razón ponderal determinada utilizando los métodos de la presente descripción para determinar si el sujeto sufre o no de una enfermedad tal como la insuficiencia cardíaca. Alternativamente, se puede usar la razón molar o la razón ponderal aquí descrita para determinar si un sujeto que sufre de insuficiencia cardíaca debe ser clasificado en cualquiera de las Clasificaciones de la New York Heart Association (NYHA) I, II, III o IV, o si un sujeto clasificado en una determinada Clasificación de la New York Heart Association ha progresado a una Clasificación de la New York Heart Association diferente (v.g., el sujeto fue inicialmente clasificado como Clasificación II de la New York Heart Association y luego el sujeto progresa a la

Clasificación III de la New York Heart Association). Específicamente, se puede determinar la gravedad o progresión de la enfermedad, tal como la enfermedad cardiovascular, en un sujeto usando un método consistente en las siguientes etapas:

- 5 (a) obtención de una muestra de ensayo de un sujeto;  
 (b) determinación de la cantidad de hBNP en la muestra de ensayo de acuerdo con cualquiera de los  
 inmunoensayos aquí descritos (v.g., previamente en la Sección B);  
 (c) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;  
 10 (d) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a  
 la cantidad de hBNP en dicha muestra; y  
 (e) correlación de la razón molar o de la razón ponderal con la gravedad o progresión de la enfermedad en el  
 sujeto. Específicamente, al correlacionar la razón molar o la razón ponderal con la gravedad de la  
 enfermedad cardiovascular en un sujeto, la razón es inferior a un nivel predeterminado con mayor gravedad y  
 la razón es superior a un nivel predeterminado con menor gravedad. Al correlacionar la razón molar o la  
 15 razón ponderal con la progresión de la enfermedad en un sujeto, la razón es inferior en comparación con la  
 de una muestra de ensayo anterior del sujeto con progresión y la razón está inalterada o es superior en  
 comparación con la de una muestra de ensayo anterior del sujeto sin progresión o con mejoría de la  
 enfermedad cardiovascular. Se puede monitorizar la progresión de la enfermedad, tal como la enfermedad  
 cardiovascular, antes de comenzar el tratamiento en un sujeto o después del comienzo del tratamiento en un  
 20 sujeto.

Adicionalmente, se puede usar la razón molar o la razón ponderal determinada usando los métodos aquí descritos  
 para determinar o identificar si un sujeto podría tener una mutación en sus genes de corina o furina. La corina y la  
 25 furina son serina proteasas que se sabe escinden las proformas de péptidos natriuréticos (v.g., la corina escinde  
 tanto el proANP como el proBNP y la furina escinde el proCNP y el proBNP) para originar sus formas activas (ANP,  
 BNP, CNP) y sus péptidos inactivos N-terminales. Las mutaciones en estos genes pueden dar lugar a un  
 procesamiento incompleto de las prohormonas a medida que se necesitan, produciéndose menores cantidades  
 30 circulantes de péptido activo. Por lo tanto, se esperaría que un sujeto que tenga una mutación en la corina o la furina  
 tuviera una mayor proporción entre proBNP humano y hBNP que un sujeto que carezca de la mutación o que tenga  
 un alelo de tipo salvaje. Esto podría ayudar a identificar a sujetos que se podrían beneficiar de un tratamiento para la  
 enfermedad cardiovascular, especialmente para determinar o identificar a un sujeto que se beneficiaría del  
 tratamiento con un derivado del péptido natriurético para la enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, dicho método  
 puede comprender las siguientes etapas:

- 35 (a) obtención de una muestra de ensayo del sujeto que exhibe uno o más indicios clínicos asociados a  
 enfermedad cardiovascular (tal como, por ejemplo, un sujeto que tiene una mutación en sus genes de corina  
 o furina);  
 (b) determinación de la cantidad de BNP humano en la muestra de ensayo de acuerdo con cualquiera de los  
 inmunoensayos aquí descritos (v.g., previamente en la Sección B);  
 40 (c) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;  
 (d) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a  
 la cantidad de hBNP en dicha muestra;  
 (e) determinación de si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (d) es superior o inferior a  
 un nivel predeterminado; y  
 45 (f) identificación de si el sujeto se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético en base  
 a la determinación de la etapa (e). Específicamente, si la razón determinada en la etapa (d) es inferior en  
 comparación al nivel predeterminado, se identificaría al sujeto como un sujeto que no se beneficiaría del  
 tratamiento con un derivado del péptido natriurético. Sin embargo, si la razón determinada en la etapa (d) es  
 superior al nivel predeterminado, entonces se identificaría al sujeto como un sujeto que se beneficiaría del  
 50 tratamiento con un derivado del péptido natriurético. Un ejemplo de un derivado del péptido natriurético  
 humano que podría utilizarse para tratar a un sujeto es la nesiritida. Un experto en la técnica podría  
 determinar fácilmente el tipo y la cantidad de tratamiento para dicho sujeto utilizando técnicas rutinarias.

Más aún, se puede usar la razón molar o la razón ponderal determinada usando los métodos aquí descritos para  
 55 determinar si un sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración a dicho  
 sujeto de una o más composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, dicho método puede comprender las siguientes  
 etapas:

- 60 (a) obtención de una primera muestra de ensayo del sujeto antes de haberle administrado una o más  
 composiciones farmacéuticas;  
 (b) determinación de la cantidad de BNP humano en la muestra de ensayo según cualquiera de los  
 inmunoensayos aquí descritos (v.g., previamente en la Sección B);  
 (c) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;  
 (d) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a  
 65 la cantidad de hBNP en dicha muestra;  
 (e) obtención de una segunda muestra de ensayo del sujeto tras haberle administrado una o más

composiciones farmacéuticas;

(f) determinación de la cantidad de BNP humano en la segunda muestra de ensayo según cualquiera de los inmunoensayos aquí descritos (v.g., previamente en la Sección B);

(g) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha segunda muestra de ensayo;

(h) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha segunda muestra de ensayo; y

(i) comparación de la razón molar o de la razón ponderal determinada en la etapa (d) con la razón molar o ponderal en la etapa (h). Específicamente, si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (d) permanece inalterada cuando se compara con la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (h), entonces se determina que el sujeto no ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración de una o más composiciones farmacéuticas. Si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (d) está alterada (es superior o inferior) cuando se compara con la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (h), entonces se determina que el sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración de una o más composiciones farmacéuticas.

#### D. Adaptaciones de los métodos

La descripción que aquí se da puede ser también adaptada para uso en una variedad de sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquéllos en los que la fase sólida está constituida por una micropartícula), según se describe, v.g., en las Patentes EE.UU. N° 5.089.424 y 5.006.309 y como, v.g., comercializa Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo, aunque sin limitación, los instrumentos ARCHITECT®, AxSYM®, IMx®, PRISM® y Quantum™ II de Abbott, así como otras plataformas. Más aún, la descripción es eventualmente adaptable para el sistema de inmunoensayo electroquímico Point of Care (i-STAT™) comercial de Abbott Laboratories para realizar inmunoensayos en sándwich. Se describen inmunosensores y sus métodos de fabricación y de operación en dispositivos de ensayo de un solo uso, por ejemplo, en la Patente EE.UU. N° 5.063.081, en la Solicitud de Patente EE.UU. 2003/0170881, en la Solicitud de Patente EE.UU. 2004/0018577, en la Solicitud de Patente EE.UU. 2005/0054078 y en la Solicitud de Patente EE.UU. 2006/0160164.

#### E. Ejemplos de kits (no incluidos en la presente invención)

La presente descripción aquí dada puede ser también adaptada para empleo en una variedad de kits para uso en sistemas y plataformas automatizados y semiautomatizados, v.g., comercializados por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo, aunque sin limitación, los instrumentos ARCHITECT®, AxSYM®, IMx®, PRISM® y Quantum™ II de Abbott Laboratories y el sistema de inmunoensayo electroquímico Point of Care (i-STAT™) comercial de Abbott Laboratories para realizar inmunoensayos en sándwich, así como otras plataformas.

Dichos kits pueden incluir uno o más de los reactivos de inmunodiagnóstico (v.g., anticuerpos) aquí descritos. Más específicamente, si el kit es un kit para realizar un inmunoensayo, el kit puede eventualmente contener (1) al menos un anticuerpo de captura y uno de detección que se unen al hBNP y juntos exhiben una reducida reactividad cruzada con el proBNP humano y el proBNP-NT humano, y (2) una o más instrucciones para realizar el inmunoensayo. Los reactivos de inmunodiagnóstico de la presente descripción pueden estar incluidos en dicho kit de ensayo como un anticuerpo de captura, como un anticuerpo de detección o a la vez como un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección. Por ejemplo, se puede incluir el anticuerpo Clone 3 en el kit como un anticuerpo de captura y se puede incluir el anticuerpo AM1 en el kit como un anticuerpo de detección. Alternativamente, se puede incluir el anticuerpo Clone 3 en el kit como un anticuerpo de captura y se puede incluir el anticuerpo 8.1 en el kit como un anticuerpo de detección. Eventualmente, el kit puede contener también al menos un calibrador o control. Se puede incluir cualquier calibrador o control en el kit. Preferiblemente, sin embargo, el calibrador o control es hBNP, especialmente la SEC ID N° 4 previamente aquí descrita. Por consiguiente, los kits pueden incluir al menos un calibrador, o al menos un control, o una combinación de al menos un calibrador y al menos un control.

Eventualmente, los kits pueden también incluir reactivos de control de calidad (v.g., paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe, v.g., en una variedad de prospectos de productos de inmunodiagnóstico. Se pueden preparar eventualmente miembros de paneles de sensibilidad para el BNP humano en cantidades variables que contengan, v.g., cantidades conocidas de antígeno hBNP que vayan de "bajas" a "altas", v.g., añadiendo cantidades conocidas del antígeno hBNP a un tampón de ensayo apropiado (v.g., un tampón fosfato). Estos miembros de paneles de sensibilidad son eventualmente utilizados para establecer las características de rendimiento del ensayo y son además eventualmente indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit de inmunoensayo y de la estandarización de los ensayos. También se puede emplear el antígeno hBNP como calibrador.

Los anticuerpos proporcionados en el kit pueden incorporar un marcaje detectable, tal como un fluoróforo, un resto radiactivo, una enzima, un marcaje de biotina/avidina, un cromóforo, un marcaje quimioluminiscente o similar, o el kit puede incluir reactivos para marcar los anticuerpos o reactivos para detectar los anticuerpos (v.g., anticuerpos de detección) y/o para marcar los antígenos o reactivos para detectar el antígeno. Se pueden proporcionar los anticuerpos, calibradores y/o controles en recipientes separados o se pueden predisensar en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo en placas de microtitulación.

En aún otra realización, el kit puede incluir, ya sea solo, con instrucciones o con otros aspectos del kit y de los componentes del kit, un agente de inmunodiagnóstico que contiene uno o más anticuerpos seleccionados entre el grupo consistente en 106.3, BC203, Clone 3, M1, AM1, AM5, 201.3, AM8 y 8.1.

Los kits pueden eventualmente incluir otros reactivos necesarios para realizar un ensayo diagnóstico o para facilitar las evaluaciones de control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, cofactores enzimáticos, sustratos, reactivos de detección y similares. Se pueden incluir también en el kit otros componentes, tales como tampones y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de ensayo (v.g., reactivos de pretratamiento). El kit puede incluir adicionalmente uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del kit pueden estar liofilizados, y el kit puede además incluir reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit son eventualmente proporcionados en recipientes adecuados. Como se ha indicado anteriormente, uno o más de los recipientes pueden ser una placa de microtitulación. El kit puede incluir además recipientes para mantener o almacenar una muestra (v.g., un recipiente o cartucho para una muestra de sangre o de orina). Cuando sea apropiado, el kit puede también contener eventualmente recipientes de reacción, vasos de mezcla y otros componentes que faciliten la preparación de los reactivos o de la muestra de ensayo. El kit puede incluir también uno o más instrumentos para ayudar a obtener una muestra de ensayo, tales como una jeringa, una pipeta, un fórceps, una cuchara calibrada o similar.

El kit puede además incluir eventualmente instrucciones para su uso, que pueden ser facilitadas en forma de papel o en forma leíble por ordenador, tal como un disco, CD, DVD o similar.

Se darán ahora a modo de ejemplo, y no como limitación, ejemplos de la presente descripción.

**EJEMPLO 1:** Un ensayo en sándwich para el péptido natriurético de tipo B humano (hBNP) con <10% de reactividad cruzada con el proBNP humano

Para el ensayo específico de hBNP ARCHITECT® (de aquí en adelante "Arc-hBNP"), se revistieron partículas paramagnéticas con anticuerpo monoclonal ("mAb") 3-631-436. Este mAb se une a una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 13-18 del péptido hBNP. Se hace también referencia aquí indistintamente a los anticuerpos monoclonales producidos por la línea celular de hibridoma 3-631-436 como "anticuerpo monoclonal 3-631-436" o "Clone 3" y "BNP 3-631-436 ms". Adicionalmente, la línea celular de hibridoma murina 3-631-436 fue depositada en la A.T.C.C. el 21 de Diciembre de 2004 y se le asignó el N° de Acceso A.T.C.C. PTA- 6476. Se depositó el mAb BNP 3-631-436 ms sobre una partícula paramagnética (Polymer Laboratories, Amherst, MA) utilizando las técnicas descritas en la Patente EE.UU. N° 6.162.902. Específicamente, se empleó copulación con EDAC. El EDAC es generalmente utilizado como un agente activador de carboxilo para enlaces amida con aminas primarias. Además, reacciona con grupos fosfato. Se usa en síntesis peptídica, entrecruzamiento de proteínas con ácidos nucleicos y preparación de inmunocombinados. La fórmula química para el EDAC es clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. El EDAC está comercializado por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Se lavaron las partículas y se sobrecubrieron con BSA. Estas partículas son utilizadas como reactivo de captura en el ensayo durante la primera (1ª) incubación con especímenes.

Se conjugó el anticuerpo monoclonal 106.3 L1 B24/H2 288 con éster activo de N10-(3-sulfopropil)-N-(3-carboxipropil)acridinio-9-carboxamida (también conocido como éster CPSP-acridinio) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Este mAb se une a una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 5-13 del péptido hBNP. También se hace aquí referencia indistintamente a los anticuerpos monoclonales producidos por la línea celular de hibridoma 106.3 L1 B24/H2 288 como "anticuerpo monoclonal 106.3 L1 B24/H2 288", "106.3AM1" y "AM1". Adicionalmente, se depositó la línea celular de hibridoma murina 106.3 L1 B24/H2 288 en la A.T.C.C. el 20 de Septiembre de 2005 y se le asignó el N° de Acceso A.T.C.C. PTA-6987. Se utiliza el anticuerpo 106.3AM1 marcado con acridinio en el ensayo durante la segunda (2ª) incubación para detectar el péptido hBNP unido a partículas. Se produjo la conjugación por reacción del anticuerpo 106.3AM1 con un éster de acridinio-carboxamida activado.

Se prepararon reactivos de captura adicionales (106.3AM1, BC203, 201.3, 8.1, M1) de una manera complementaria. Se utilizan estas partículas como reactivo de captura en el ensayo durante la primera (1ª) incubación con especímenes. Se prepararon reactivos de detección adicionales (conjugados 8.1, M1, 201.3, BC203 y BNP 3-631-436 ms) de una manera complementaria a la antes descrita. Se prepararon conjugados de anticuerpo-acridinio usando ésteres de acridinio-carboxamida activados. Se usan los conjugados de anticuerpo-acridinio en el ensayo durante la segunda (2ª) incubación para detectar el péptido hBNP unido a partículas.

Se realizaron todos los inmunoensayos para el hBNP en un instrumento ARCHITECT® (este instrumento está descrito en la Patente EE.UU. N° 5.468.646).

Se prepararon calibradores de hBNP de longitud total (residuos de aminoácidos 1-32) por dilución de materiales obtenidos de Peptides International, Inc. (Louisville, KY) en diluyente para calibradores de hBNP (descrito en la Publicación de Patente EE.UU. 2005/0014287). Se prepararon soluciones de proBNP humano (residuos de

aminoácidos 1-108) por dilución de proBNP humano de longitud total obtenido de HyTest Ltd. (Turku, Finlandia) en el diluyente para calibradores de hBNP. Todas las soluciones adicionadas con proBNP humano utilizadas en los experimentos del % Recuperación tenían concentraciones equivalentes a las concentraciones de calibradores de hBNP sobre una base molar.

5 Se pipetearon micropartículas revestidas con un anticuerpo de captura en un diluyente Tris/BSA mediante la sonda de toma de muestras en recipientes de reacción individuales en el centro de toma de muestras. Se suministró una alícuota que contenía un calibrador de hBNP o solución adicionada con proBNP humano a cada recipiente de reacción que contenía las micropartículas, para formar una mezcla de reacción. Se incubaron las mezclas de  
10 reacción durante aproximadamente 4 minutos a una temperatura de aproximadamente 37°C. Tras la incubación, se lavaron las mezclas de reacción con diluyente de la línea ARCHITECT® para eliminar cualquiera del péptido hBNP o del péptido proBNP humano no capturado. El diluyente de la línea ARCHITECT® está comercializado por Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois.

15 Se dispensaron entonces los conjugados de anticuerpo-acridinio diluidos a 150 ng/ml en un diluyente MES en los recipientes de reacción y se incubaron las combinaciones resultantes durante aproximadamente 4 minutos a una temperatura de aproximadamente 37°C. Tras la incubación, se lavaron los recipientes de reacción con diluyente de la línea ARCHITECT® para eliminar los materiales no unidos.

20 Se añadieron una solución de peróxido de hidrógeno y luego hidróxido de sodio a los recipientes de reacción y se midieron las señales quimioluminiscentes mediante el montaje óptico del inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) del instrumento ARCHITECT®.

25 El sistema ARCHITECT® mide las señales de acridinio, que son típicamente medidas en unidades de luz relativas (de aquí en adelante "ulr"). Se hicieron las mediciones por duplicado. Los resultados mostrados en las Tablas 1a-1f siguientes y en la Figura 1 muestran la media de los valores por duplicado de los calibradores de hBNP y curvas típicas de calibración.

30 Tabla 1a. Curvas de calibración generadas usando péptido BNP como calibrador y ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (BNP 3-631-436 ms).

mAb conjugado		106.3 AM1	BC203	8.1	M1
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM) <sup>1</sup>	ULR	ULR	ULR	ULR
0	0	1.760	803	4.159	12.324
30	8,67	4.078	1.344	15.055	13.324
150	43,3	17.137	4.691	66.922	14.847
300	86,6	38.823	11.901	126.474	22.046
1.000	288,7	238.469	83.506	437.772	104.940
2.000	577,4	625.439	269.939	908.089	330.590

<sup>1</sup>Tal como se usa en este y en todos los demás Ejemplos que aquí se dan, "pM" se refiere a picomolar, es decir, pmol/l.

## ES 2 401 741 T3

Tabla 1b. Curvas de calibración generadas usando péptido BNP como calibrador y ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (106.3AM1).

mAb conjugado		BNP 3-631-436 ms	BC203	8.1	M1
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM)	ULR	ULR	ULR	ULR
0	0	3.378	768	3.504	9.449
30	8,67	4.134	1.033	4.095	9.228
150	43,3	5.970	3.846	7.958	15.716
300	86,6	8.583	8.759	11.874	25.100
1.000	288,7	39.157	65.520	37.278	113.669
2.000	577,4	136.114	223.465	90.574	355.537

5 Tabla 1c. Curvas de calibración generadas usando péptido BNP como calibrador y ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (BC203).

mAb conjugado		BNP 3-631-436 ms	106.3AM1
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM)	ULR	ULR
0	0	1.362	1.255
30	8,67	4.993	7.237
150	43,3	21.697	35.545
300	86,6	46.450	80.470
1.000	288,7	194.134	356.040
2.000	577,4	492.653	876.600

10 Tabla 1d. Curvas de calibración generadas usando péptido BNP como calibrador y ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (201.3).

mAb conjugado		BNP 3-631-436 ms	8.1
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM)	ULR	ULR
0	0	7.387	2.983
30	8,67	8.138	3.372
150	43,3	8.533	5.938
300	86,6	11.348	11.060
1.000	288,7	32.151	59.565
2.000	577,4	86.700	213.113

15 Tabla 1e. Curvas de calibración generadas usando péptido BNP como calibrador y ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (8.1).

mAb conjugado		BNP 3-631-436 ms	106.3AM1	201.3
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM)	ULR	ULR	ULR
0	0	2.528	2.260	1.853
30	8,67	8.718	6.794	2.026
150	43,3	33.750	26.317	5.252
300	86,6	71.082	51.849	12.721
1.000	288,7	263.928	211.266	119.988
2.000	577,4	605.729	489.568	433.774

20 Tabla 1f. Curvas de calibración generadas usando péptido BNP como calibrador y ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (M1).

mAb conjugado		BNP 3-631-436 ms	106.3AM1
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM)	ULR	ULR
0	0	2.202	2.542
30	8,67	2.849	2.821
150	43,3	4.286	7.182
300	86,6	7.021	15.115
1.000	288,7	31.134	77.401
2.000	577,4	84.691	233.153

Una vez hubieron sido obtenidas las curvas calibratoras, se realizaron estudios de adición para determinar la

reactividad cruzada con el proBNP humano. Se realizó la adición de proBNP a concentraciones equimolares a través del rango de calibradores de BNP. La Figura 2 muestra el % medio de recuperación de péptido proBNP humano adicionado para combinaciones de anticuerpos seleccionadas. Las Tablas 2a-2f muestran la concentración de retrolectura media del proBNP humano en pg/ml.

5

Tabla 2a. Detección de proBNP adicionado (% de recuperación) por ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (BNP 3-631-436 ms).

mAb conjugado	106.3 AM1		BC203		8.1		M1	
	Conc. adición (pg/ml)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)
103	9,8	9,5	-5,3	-7,0	4,7	4,5	16,5	16,0
515	26,2	5,1	40,8	10,9	34,1	6,6	-295,6	-57,4
1.031	42,3	4,1	110,8	14,8	72,8	7,1	174,7	16,9
3.436	176,9	5,1	482,5	19,3	280,2	8,2	945,5	27,5
6.872	444,6	6,5	895,4	17,9	434,6	6,3	1.745,7	25,4

10 Tabla 2b. Detección de proBNP adicionado (% de recuperación) por ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (106.3AM1).

mAb conjugado	BNP 3-631-436 ms		BC203		8.1		M1	
	Conc. adición (pg/ml)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)
103	46,6	45,2	117,2	113,8	68,1	66,2	263,7	256,0
515	73,2	14,2	189,7	36,8	151,4	29,4	424,8	82,5
1.031	109,3	10,6	455,7	44,2	257,5	25,0	411,7	39,9
3.436	809,2	23,6	1.365,5	39,7	1.079,4	31,4	1.612,8	46,9
6.872	1.204,4	17,5	2.829,0	41,2	2.308,6	33,6	3.461,4	50,4

15 Tabla 2c. Detección de proBNP adicionado (% de recuperación) por ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (BC203).

mAb conjugado	BNP 3-631-436 ms		106.3AM1	
	Conc. adición (pg/ml)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)
103	14,1	13,7	9,7	9,5
515	51,9	10,1	51,4	10,0
1.031	124,5	12,1	128,4	12,5
3.436	444,6	12,9	481,2	14,0
6.872	967,1	14,1	881,5	12,8

20 Tabla 2d. Detección de proBNP adicionado (% de recuperación) por ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (201.3).

mAb conjugado	BNP 3-631-436 ms		8.1	
	Conc. adición (pg/ml)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)
103	-38,1	-37,0	31,2	30,3
515	-13,7	-2,7	52,4	10,2
1.031	57,5	5,6	28,3	2,7
3.436	0,4	0,0	59,3	1,7
6.872	96,3	1,4	210,1	3,1

Tabla 2e. Detección de proBNP adicionado (% de recuperación) por ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (8.1).

mAb conjugado	BNP 3-631-436 ms		106.3AM1		201.3	
	Conc. adición (pg/ml)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)	Retrolectura (pg/ml)
103	9,6	9,4	6,9	6,7	74,4	72,3
515	64,2	12,5	46,5	9,0	23,8	4,6
1.031	122,2	11,8	89,4	8,7	-28,0	-2,7
3.436	465,4	13,5	297,5	8,7	0,0	0,0
6.872	1.099,9	16,0	690,2	10,0	0,0	0,0

5 Tabla 2f. Detección de proBNP adicionado (% de recuperación) por ensayos de BNP seleccionados con mAb de captura anti-BNP (M1).

mAb conjugado	BNP 3-631-436 ms		106.3AM1	
	Conc. adición (pg/ml)	Retrolectura	Recuperación (%)	Retrolectura
103	71,0	68,9	26,9	26,2
515	189,3	36,8	158,4	30,7
1.031	257,5	25,0	246,0	23,9
3.436	1.058,4	30,8	746,8	21,7
6.872	1.673,7	24,4	1.350,4	19,7

10 Estos datos confirman configuraciones de ensayo que son específicas para el BNP humano con menos de aproximadamente un 20%, o aproximadamente un 15%, y/o aproximadamente un 10% de reactividad cruzada con el proBNP. Por ejemplo, dos configuraciones de ensayo, BNP 3-631-436 ms/106.3 AMI y BNP 3-631-436 ms/8.1, muestran menos de un 10% de reactividad cruzada con el proBNP y, por lo tanto, son ensayos específicos para el BNP.

15 **Ejemplo 2:** Un ensayo en sándwich para el propéptido natriurético de tipo B humano (proBNP humano) sin reactividad cruzada para el hBNP

20 Para el ensayo específico de proBNP humano ARCHITECT® (de aquí en adelante "proBNP humano Arc"), se revistieron partículas paramagnéticas con el mAb 106.3AM1 antes descrito. Se depositó el mAb 106.3AM1 sobre una partícula paramagnética (Polymer Laboratories, Amherst, MA) según se ha descrito anteriormente empleando las técnicas descritas en la Patente EE.UU. N° 6.162.902. Se usan estas partículas como reactivo de captura en el ensayo durante la primera (1ª) incubación con especímenes.

25 Se conjugó el anticuerpo monoclonal 18H5 con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Este mAb se une a una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 13-27 del péptido proBNP humano, y, por lo tanto, se une fuera del área de posible glicosilación. El anticuerpo monoclonal 18H5 está comercializado por HyTest Ltd.(Turku, Finlandia). Se usa anticuerpo 18H5 marcado con acridinio en el ensayo durante la segunda (2ª) incubación para detectar el péptido proBNP humano unido a partículas. Se produjo la conjugación por reacción de anticuerpo 18H5 con un éster activado de acridinio-carboxamida.

30 Todos los inmunoensayos para el proBNP humano fueron realizados en un instrumento ARCHITECT®. Se prepararon calibradores de proBNP humano (residuos de aminoácidos 1-108) por dilución de materiales obtenidos de HyTest Ltd. (Turku, Finlandia) en diluyente para calibradores de hBNP. Se usaron las soluciones de calibradores de hBNP del Ejemplo 1 como soluciones adicionadas con hBNP. Todas las soluciones de hBNP y de proBNP humano utilizadas eran de igual concentración sobre una base molar.

35 Se pipetearon micropartículas revestidas con el anticuerpo de captura 106.3AM1 en un diluyente Tris/BSA mediante la sonda de toma de muestras en recipientes de reacción individuales en el centro de toma de muestras. Se suministró una alícuota que contenía un calibrador de proBNP humano o solución adicionada con hBNP a cada recipiente de reacción que contenía las micropartículas, para formar una mezcla de reacción. Se incubaron las mezclas de reacción durante aproximadamente 4 minutos a una temperatura de aproximadamente 37°C. Tras la incubación, se lavaron las mezclas de reacción con diluyente de la línea ARCHITECT® para retirar cualquier péptido proBNP humano o péptido hBNP no capturado.

45 Se dispensó entonces el conjugado anticuerpo 18H5-acridinio diluido a 150 ng/ml en un diluyente MES en los recipientes de reacción y se incubaron las combinaciones resultantes durante aproximadamente 4 minutos a una temperatura de aproximadamente 37°C. Tras la incubación, se lavaron los recipientes de reacción con diluyente de la línea ARCHITECT® para retirar los materiales no unidos.

Se añadieron una solución de peróxido de hidrógeno y luego hidróxido de sodio a los recipientes de reacción y se midieron las señales quimioluminiscentes mediante el montaje óptico de inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) del instrumento ARCHITECT®.

Se realizaron las mediciones por triplicado. Los resultados mostrados en la Tabla 3 a continuación y en la Figura 3 muestran la media de los valores por triplicado de los calibradores de proBNP humano y una curva de calibración típica.

Tabla 3. Curva de calibración generada utilizando péptido proBNP como calibrador y un ensayo específico para proBNP.

mAb $\mu$ partícula mAb conjugado		106.3AM1 18H5
Concentración (pg/ml)	Concentración (pM)	ULR
0	0	951
103	8,67	2.809
515	43,3	10.806
1.031	86,6	23.933
3.436	288,7	83.741
6.872	577,4	181.248

Específicamente, los resultados de la Tabla 4 muestran la concentración de retrolectura media del hBNP en pg/ml y el % de recuperación del péptido hBNP adicionado.

Tabla 4. Detección del BNP adicionado por medio de un ensayo específico para proBNP.

mAb $\mu$ partícula mAb conjugado	106.3 AMI 18H5	
	Retrolectura (pg/ml)	Recuperación (%)
Conc. adición (pg/ml)		
150	-0,7	-0,5
300	-1,4	-0,5
1.000	0,1	0,0
2.000	-0,1	0,0

Así, como se ha mostrado anteriormente, el ensayo con 106.3 AM1 y 18 H5 detecta sólo el proBNP humano, sin reactividad cruzada con el hBNP.

**Ejemplo 3:** Medición de la razón proBNP humano/hBNP en muestras clínicas

Se obtuvieron veinte especímenes de plasma en EDTA de ARUP Laboratories (Salt Lake City, UT). Se enviaron las muestras en hielo seco y se guardaron a -70°C antes de su uso. Se obtuvieron las muestras tanto de hombres como de mujeres de edades variables para quienes un médico había pedido una prueba de BNP.

Se realizaron mediciones específicas de hBNP ARCHITECT® como se ha descrito anteriormente utilizando la combinación de micropartículas de BNP 3-631-436 ms/conjugado de 106.3AM1 acridinio. Se realizaron mediciones específicas de proBNP humano ARCHITECT® como se ha descrito anteriormente utilizando la combinación de  $\mu$ partícula de 106.3AM1/conjugado de 18H5 acridinio. Todos los inmunoensayos para hBNP y proBNP humano fueron realizados en el instrumento ARCHITECT® usando los calibradores de hBNP (residuos de aminoácidos 1-32) y los calibradores de proBNP humano (residuos de aminoácidos 1-108) preparados anteriormente.

Se midieron todos los calibradores de hBNP y proBNP humano por duplicado usando el kit específico de analito y se ajustaron usando un método de reducción de datos punto por punto para generar una curva de calibración para cada analito. Se determinaron las concentraciones de hBNP y proBNP en cada muestra de los pacientes a partir de mediciones simples leídas en la curva de calibración respectiva. En la Tabla 5 siguiente se muestran los valores de retrolectura para las concentraciones de hBNP y de proBNP humano en cada muestra de los pacientes. Específicamente, se muestran los resultados de la Tabla 5 en pg/ml o picomoles (pM) de hBNP o proBNP humano en la muestra del paciente.

Tabla 5. Razones de proBNP/BNP o BNP/proBNP en muestras clínicas

Muestra	Medición ponderal				Medición molar			
	pg/ml		Razón ponderal		pM		Razón molar	
	BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP	BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP
ARUP01	58,1	432,5	0,134	7,44	16,8	36,3	0,462	2,17

ARUP02	130,4	986,0	0,132	7,56	37,6	82,8	0,454	2,20
ARUP03	34,0	308,0	0,110	9,07	9,8	25,9	0,379	2,64
ARUP04	148,1	708,8	0,209	4,79	42,8	59,6	0,718	1,39
ARUP05	307,0	2.283,6	0,134	7,44	88,6	191,9	0,462	2,16
ARUP06	48,7	331,2	0,147	6,80	14,1	27,8	0,505	1,98
ARUP07	81,9	577,2	0,142	7,05	23,6	48,5	0,487	2,05
ARUP08	3,7	73,1	0,051	19,72	1,1	6,1	0,174	5,74
ARUP09	33,0	205,4	0,161	6,22	9,5	17,3	0,552	1,81
ARUP10	186,9	1.167,4	0,160	6,25	53,9	98,1	0,550	1,82
ARUP11	547,7	3.329,4	0,165	6,08	158,1	279,7	0,565	1,77
ARUP12	68,6	377,5	0,182	5,50	19,8	31,7	0,624	1,60
ARUP13	781,7	5.244,2	0,149	6,71	225,7	440,6	0,512	1,95
ARUP14	119,0	1.042,7	0,114	8,76	34,3	87,6	0,392	2,55
ARUP15	60,2	714,8	0,084	11,87	17,4	60,1	0,290	3,45
ARUM16	942,0	5.394,6	0,175	5,73	272,0	453,3	0,600	1,67
ARUP17	591,6	4.862,2	0,122	8,22	170,8	408,5	0,418	2,39
ARUP18	255,4	1.531,1	0,167	6,00	73,7	128,6	0,573	1,74
ARUP19	197,2	1.746,1	0,113	8,85	56,9	146,7	0,388	2,58
ARUP20	36,5	333,0	0,110	9,13	10,5	28,0	0,376	2,66

5 También se determinaron las razones molares y ponderales del proBNP humano con respecto al BNP o del hBNP con respecto al proBNP humano. Las razones molares de proBNP/BNP (véase la Tabla 5 anterior) iban de 1,39 a 5,74. Las razones molares de BNP/proBNP iban de 0,17 a 0,72. Se observó un rango aproximado de cuatro veces en las razones. Las razones ponderales de proBNP/BNP iban de 4,79 a 19,72 y para BNP/proBNP iban de 0,051 a 0,209. De nuevo, se observó un rango aproximado de cuatro veces en las razones.

**Ejemplo 4:** Medición de las razones molares y ponderales de ProBNP humano/hBNP en muestras clínicas

10 Se obtuvieron setenta y tres (73) especímenes de plasma HF con Clasificaciones designadas I-IV de la New York Heart Association de ProMedDx, LLC (Norton, MA). Se enviaron las muestras en hielo seco y se guardaron a -70°C antes de su uso.

15 Se realizaron mediciones específicas de hBNP ARCHITECT® como se ha descrito anteriormente usando la combinación micropartícula de Clon 3/conjugado 106.3AM1 acridinio. Se realizaron mediciones específicas de proBNP humano ARCHITECT® como se ha descrito anteriormente usando la combinación micropartícula de 106.3AM1/conjugado 18H5 acridinio. Todos los inmunoensayos para el hBNP y el proBNP humano fueron realizados en el instrumento ARCHITECT® usando los calibradores de hBNP (residuos de aminoácidos 1-32) y los calibradores de proBNP humano (residuos de aminoácidos 1-108) preparados anteriormente.

20 Se midieron todos los calibradores de hBNP y proBNP humano por duplicado usando el kit específico de analito y se ajustaron usando un método de reducción de datos punto por punto para generar una curva de calibración para cada analito. Se determinaron las concentraciones de hBNP y proBNP humano en cada muestra de los pacientes a partir de mediciones simples leídas en la curva de calibración respectiva. Se muestran los valores de retrolectura para las concentraciones de hBNP y proBNP humano en cada muestra de los pacientes en las Tablas 6 A y B siguientes. También se muestran las razones molares y ponderales de proBNP humano/hBNP y hBNP/proBNP humano en las Tablas 6 A y B. La Figura 4 es el gráfico de las concentraciones determinadas de hBNP frente a proBNP humano, que muestra una correlación general entre los valores. Específicamente, los resultados de la Figura 4 son mostrados en pM de hBNP o de proBNP humano en las muestras de los pacientes. Se muestra el valor medio de las razones molares y ponderales proBNP humano/hBNP para cada Clasificación NYHA en las Tablas 7 A y B. Se agrupa conjuntamente a los pacientes de la clase NYHA III y IV debido a la gravedad de la enfermedad y al pequeño (n=3) número de muestras NYHA IV estudiadas.

25

30

Tabla 6A

BNP	Clase NYHA I				Clase NYHA II				Clase NYHA III/IV			
	pg/ml		Razón ponderal		pg/ml		Razón ponderal		pg/ml		Razón ponderal	
	proBNP	BNP/pro	BNP/proBNP	pro/BNP	BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP	BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP
5,1	302,1	0,017	59,22	5,6	674,8	0,008	119,83	16,3	570,6	0,029	34,93	
4,8	149,4	0,032	31,38	37,6	1054,0	0,036	28,00	90,9	3167,3	0,029	34,86	
128,2	1640,7	0,078	12,80	31,3	564,5	0,055	18,05	18,2	685,6	0,027	37,72	
10,5	1476,6	0,007	140,88	285,31	3618,6	0,079	12,68	4,3	241,3	0,018	55,50	
55,0	1210,9	0,045	22,03	11,4	476,0	0,024	41,82	29,3	1193,8	0,025	40,71	
44,1	1236,0	0,036	28,03	68,1	1814,1	0,038	26,65	48,5	464,2	0,104	9,57	
34,4	510,5	0,067	14,82	30,5	3308,9	0,009	108,6	168,0	1505,3	0,112	8,96	
115,2	1159,0	0,099	10,06	60,6	1310,6	0,046	21,64	552,7	6198,7	0,089	11,21	
28,8	668,9	0,043	23,20	19,6	265,8	0,074	13,54	137,6	1996,1	0,069	14,51	
154,5	3059,4	0,050	19,80	35,8	483,8	0,074	13,51	25,9	410,7	0,063	15,84	
				346,7	3845,9	0,090	11,09	10,2	237,4	0,043	23,17	
				230,4	3109,6	0,074	13,50	65,1	1586,6	0,041	24,36	
				40,2	619,6	0,065	15,42	136,0	1799,9	0,076	13,23	
				27,2	733,1	0,037	26,97	90,8	1670,4	0,054	18,39	
				33,6	578,6	0,058	17,23	107,4	2367,1	0,045	22,05	
				390,4	5912,3	0,066	15,14	29,7	733,3	0,040	24,70	
				12,91	195,9	0,066	15,17	172,2	3504,0	0,049	20,35	
				21,1	314,6	0,067	14,93	84,2	2083,1	0,040	24,74	
				7,2	179,0	0,040	24,78	44,2	1162,2	0,038	26,32	
				71,9	1089,9	0,066	15,16	40,4	786,1	0,051	19,48	
				55,5	1159,2	0,048	20,88	99,1	2328,9	0,043	23,50	
				6,5	118,2	0,055	18,18	30,0	714,8	0,042	23,83	
				8,2	221,0	0,037	26,86	69,6	1013,4	0,069	14,57	
				94,4	2265,6	0,042	24,01	18,2	268,8	0,068	14,78	
				175,7	1621,8	0,108	9,23	189,7	2717,7	0,070	14,33	
				192,0	1916,4	0,100	9,98	100,7	3810,9	0,026	37,84	
				80,1	881,4	0,091	11,01	47,9	701,5	0,068	14,65	
								70,0	1312,2	0,053	18,75	
								47,7	674,5	0,071	14,15	
								34,8	623,9	0,056	17,92	
								231,9	2944,1	0,079	12,70	
								107,7	1343,8	0,080	12,48	
								79,1	1593,9	0,050	20,16	
								41,0	1374,1	0,030	33,54	
								361,6	6792,8	0,053	18,79	
								178,3	3417,4	0,052	19,17	

Tabla 6B

Clase NYHA I				Clase NYHA II				Clase NYHA III/IV			
pM		Razón molar		pM		Razón molar		pM		Razón molar	
BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP	BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP	BNP	proBNP	BNP/pro	pro/BNP
1,5	25,4	0,058	17,24	1,6	56,7	0,029	34,87	4,7	47,9	0,098	10,17
1,4	12,6	0,109	9,13	10,9	88,6	0,123	8,15	26,2	266,1	0,099	10,15
37,0	137,9	0,268	3,73	9,0	47,4	0,190	5,25	5,2	57,6	0,091	10,98
3,0	124,1	0,024	41,00	82,4	304,0	0,271	3,69	1,3	20,3	0,062	16,15
15,9	101,7	0,156	6,41	3,3	40,0	0,082	12,17	8,5	100,3	0,084	11,85
12,7	103,8	0,123	8,16	19,6	152,4	0,129	7,76	14,0	39,0	0,359	2,79
9,9	42,9	0,232	4,31	8,8	278,0	0,032	31,61	48,5	126,5	0,383	2,61
33,3	97,4	0,342	2,93	17,5	110,1	0,159	6,30	159,6	520,8	0,306	3,26
8,3	56,2	0,148	6,75	5,7	22,3	0,254	3,94	39,7	167,7	0,237	4,22
44,6	257,1	0,174	5,76	10,3	40,6	0,254	3,93	7,5	34,5	0,217	4,61
				100,1	323,1	0,310	3,23	3,0	19,9	0,148	6,74
				66,5	261,3	0,255	3,93	18,8	133,3	0,141	7,09
				11,6	52,1	0,223	4,49	39,3	151,2	0,260	3,85
				7,8	61,6	0,127	7,85	26,2	140,3	0,187	5,35
				9,7	48,6	0,199	5,01	31,0	198,9	0,156	6,42
				112,7	496,8	0,227	4,41	8,6	61,6	0,139	7,19
				3,7	16,5	0,226	4,42	49,7	294,4	0,169	5,92
				6,1	26,4	0,230	4,35	24,3	175,0	0,139	7,20
				2,1	15,0	0,139	7,21	12,7	97,6	0,131	7,66
				20,8	91,6	0,227	4,41	11,7	66,0	0,176	5,67
				16,0	97,4	0,165	6,08	28,6	195,7	0,146	6,84
				1,9	9,9	0,189	5,29	8,7	60,1	0,144	6,93
				2,4	18,6	0,128	7,82	20,1	85,1	0,236	4,24
				27,2	190,4	0,143	6,99	5,3	22,6	0,233	4,30
				50,7	136,3	0,372	2,69	54,8	228,3	0,240	4,17
				55,4	161,0	0,344	2,90	29,1	320,2	0,091	11,01
				23,1	74,1	0,312	3,20	13,8	58,9	0,235	4,26
								20,2	110,2	0,183	5,46
								13,8	56,7	0,243	4,12
								10,1	52,4	0,192	5,22
								66,9	247,4	0,271	3,70
								31,1	112,9	0,275	3,63
								22,8	133,9	0,170	5,87
								11,8	115,5	0,102	9,76
								104,4	570,7	0,183	5,47
								51,5	287,1	0,179	5,58

Tabla 7A

Razón ponderal media	Clase NYHA		
	I (n=10)	II (n=27)	III/IV (n=36)
BNP/proBNP	0,048	0,058	0,054
ProBNP/BNP	36,22	25,70	21,99

Tabla 7B

Razón molar media	Clase NYHA		
	I (n=10)	II (n=27)	III/IV (n=36)
BNP/proBNP	0,163	0,198	0,186
ProBNP/BNP	10,54	7,48	6,40

Se halló una correlación entre la razón de proBNP humano y hBNP en sujetos que tenían insuficiencia cardíaca designados en las Clasificaciones I-IV de la New York Heart Association; a saber, se observó una disminución en la razón proBNP humano/hBNP (molar o ponderal) con un aumento en la gravedad de la enfermedad, según se midió mediante indicios clínicos (es decir, un aumento en la clase NYHA).

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente descripción está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a la misma. Los complejos moleculares y los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos aquí descritos son actualmente representativos de realizaciones preferidas, son ejemplares y no pretenden constituir limitaciones del alcance de la presente descripción. Será fácilmente obvio para un experto en la técnica que se pueden hacer sustituciones y modificaciones diversas en la descripción que aquí se da sin desviarse de su alcance y espíritu.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la que la descripción pertenece.

La descripción ilustrativamente aquí descrita puede ser adecuadamente llevada a la práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no estén específicamente aquí mostrados. Así, por ejemplo, en cada caso aquí, cualquiera de los términos "que comprende," "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazado con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones empleados son utilizados como términos de descripción y no de limitación, y no hay ninguna intención de excluir en el uso de dichos términos y expresiones cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o sus porciones.

### Lista de secuencias

<110> Moore, Jeff Shih, Jessie

<120> Ensayo de péptido natriurético de tipo B humano que tiene una reducida reactividad cruzada con otras formas peptídicas

<130> 8480WOO1

<160> 4

<170> Patent In versión 3.4

<210> 1

<211> 134

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 401 741 T3

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
 1 5 10 15

Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro  
 20 25 30

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn  
 35 40 45

His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu  
 50 55 60

Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
 65 70 75 80

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr  
 85 90 95

Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys  
 100 105 110

Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys  
 115 120 125

Lys Val Leu Arg Arg His  
 130

<210> 2  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

5

10

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly



## REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación *in vitro* de la gravedad de la enfermedad cardiovascular en un sujeto, cuyo método *in vitro* consiste en las siguientes etapas:

- (a) determinación de la cantidad de hBNP en una muestra de ensayo según un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP presente;
- (b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;
- (c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra; y
- (d) correlación de la razón molar o de la razón ponderal con la gravedad de la enfermedad cardiovascular en el sujeto, donde, si la razón es inferior a un nivel predeterminado, se determina que el sujeto tiene una mayor gravedad de la enfermedad cardiovascular, y, si la razón es superior a un nivel predeterminado, se determina que el sujeto tiene una menor gravedad de la enfermedad cardiovascular;

donde dicho inmunoensayo para determinar la cantidad de hBNP tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo y consiste en las siguientes etapas:

(I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;

(II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado a un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y

(III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se utilizan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

2. El método *in vitro* de la reivindicación 1, donde la enfermedad cardiovascular es seleccionada entre el grupo consistente en enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, hipertensión, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca.

3. Un método de monitorización *in vitro* de la progresión de la enfermedad cardiovascular en un sujeto, cuyo método *in vitro* consiste en las siguientes etapas:

(a) determinación de la cantidad de hBNP en la muestra de ensayo según un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP;

(b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;

(c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra; y

(d) correlación de la razón molar o de la razón ponderal con la progresión de la enfermedad en el sujeto, donde la razón es inferior en comparación con la de una muestra de ensayo anterior del sujeto con progresión y la razón está inalterada o es superior en comparación con la de una muestra de ensayo anterior del sujeto sin progresión o con mejoría de la enfermedad cardiovascular;

donde dicho inmunoensayo para determinar la cantidad de hBNP tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo y consiste en las siguientes etapas:

(I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;

(II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado a un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y

(III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

5 donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

10 4. El método *in vitro* de la reivindicación 3, donde se realiza dicha monitorización después del tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

5. Un método de identificación *in vitro* de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético para la enfermedad cardiovascular, cuyo método *in vitro* consiste en las siguientes etapas:

15 (a) determinación de la cantidad de BNP humano en una muestra de ensayo de un sujeto que exhibe uno o más indicios clínicos asociados a enfermedad cardiovascular, cuya determinación es llevada a cabo con un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP;

(b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;

20 (c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra;

(d) determinación de si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (c) es superior o inferior a un nivel predeterminado; y

25 (e) identificación de si el sujeto se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético en base a la determinación de la etapa (d), donde, si la razón es inferior en comparación con el nivel predeterminado, se identifica al sujeto como un sujeto que no se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético, y además donde, si la razón es superior a un valor predeterminado, entonces se identifica al sujeto como un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un derivado del péptido natriurético;

30 donde dicho inmunoensayo para determinar la cantidad de BNP humano tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo y consiste en las siguientes etapas:

35 (I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;

40 (II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado a un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y

45 (III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

50 donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se utilizan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

6. El método *in vitro* de la reivindicación 5, donde el derivado del péptido natriurético es la nesiritida.

7. Un método de determinación *in vitro* de si un sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración a dicho sujeto de una o más composiciones farmacéuticas, cuyo método *in vitro* consiste en las siguientes etapas:

55 (a) determinación de la cantidad de BNP humano en una muestra de ensayo antes de haber administrado al sujeto una o más composiciones farmacéuticas con un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de hBNP presente en una muestra de ensayo;

(b) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha muestra;

60 (c) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la cantidad de hBNP en dicha muestra;

(d) determinación de la cantidad de BNP humano en una segunda muestra de ensayo del sujeto después de haber administrado al sujeto una o más composiciones farmacéuticas, cuya determinación es llevada a cabo con dicho inmunoensayo;

65 (e) determinación de la cantidad de proBNP humano en dicha segunda muestra de ensayo;

(f) determinación de la razón molar o de la razón ponderal de la cantidad de proBNP humano con respecto a la

cantidad de hBNP en dicha segunda muestra de ensayo; y

(g) comparación de la razón molar o de la razón ponderal determinada en la etapa (c) con la razón molar o la razón ponderal de la etapa (f), donde, si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (c) está inalterada cuando se compara con la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (f), entonces se determina que el sujeto no ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración de una o más composiciones farmacéuticas, y además donde, si la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (c) está alterada cuando se compara con la razón molar o la razón ponderal determinada en la etapa (f), entonces se determina que el sujeto ha sufrido una complicación cardiovascular como resultado de la administración de una o más composiciones farmacéuticas;

donde dicho inmunoensayo para determinar la cantidad de BNP humano tiene una reducida reactividad cruzada con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo y consiste en las siguientes etapas:

(I) contacto de al menos un anticuerpo de captura que se une a hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un anticuerpo inmovilizado con dicha muestra de ensayo, para formar una primera mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP, donde dicho anticuerpo de captura comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M;

(II) contacto de dicha primera mezcla que contiene el complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP con al menos un anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado a un marcaje detectable, para formar una segunda mezcla que contiene un complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección, donde el anticuerpo de detección comprende uno o más anticuerpos que tienen una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de entre aproximadamente  $3,0 \times 10^{-7}$  y aproximadamente  $1,0 \times 10^{-13}$  M; y

(III) determinación de la cantidad del complejo de al menos un anticuerpo de captura-hBNP-al menos un anticuerpo de detección formado en la etapa (II) detectando el marcaje detectable como medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de ensayo,

donde el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección, cuando se usan conjuntamente, exhiben una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 20% con cualquier proBNP humano presente en la muestra de ensayo.

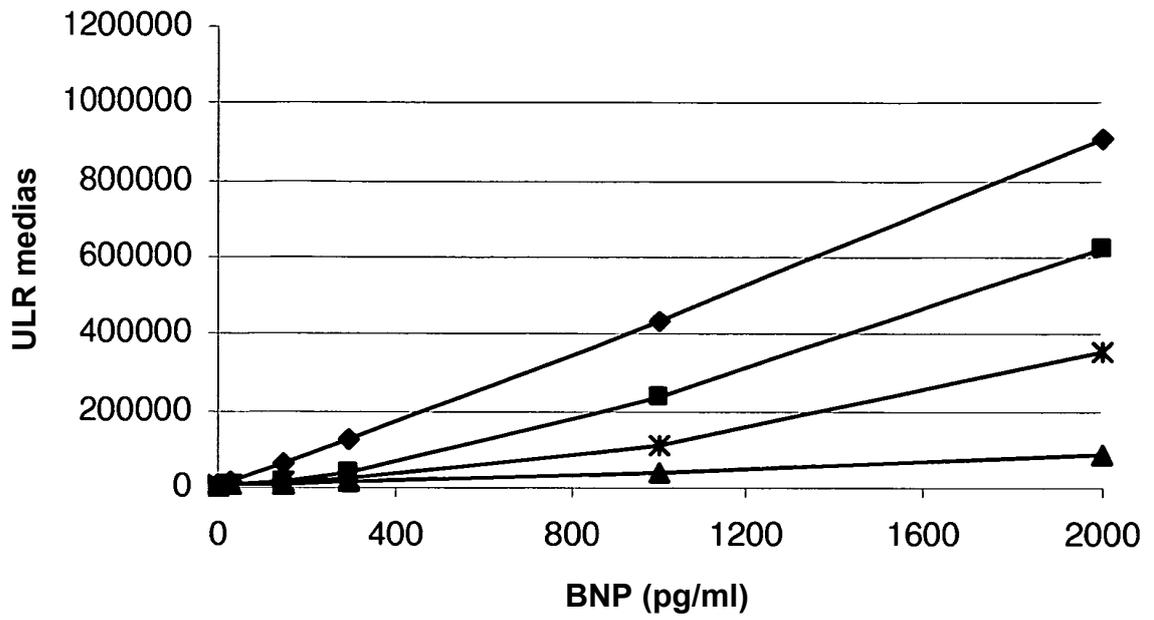


Figura 1

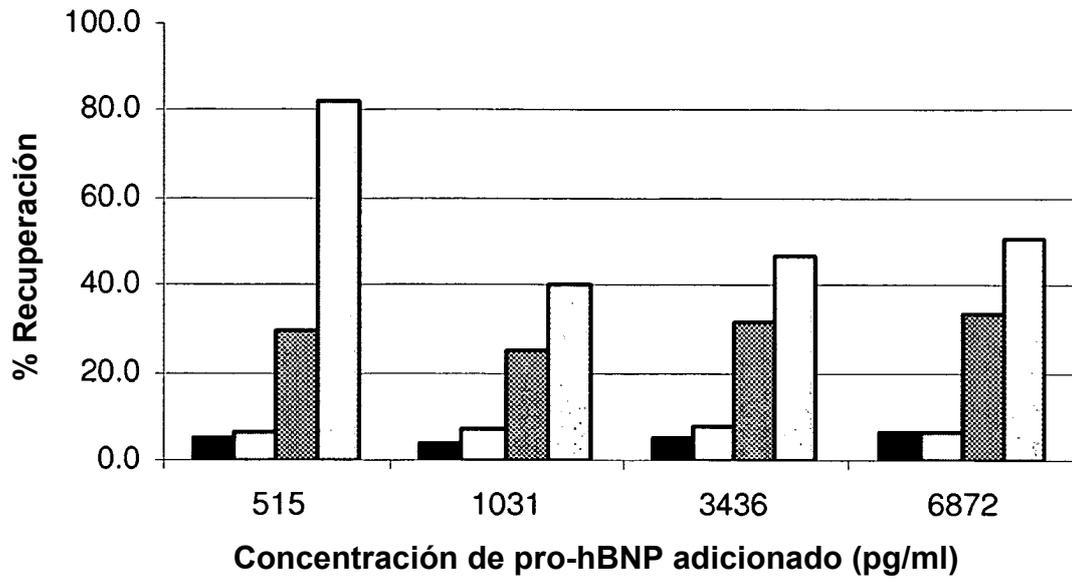


Figura 2

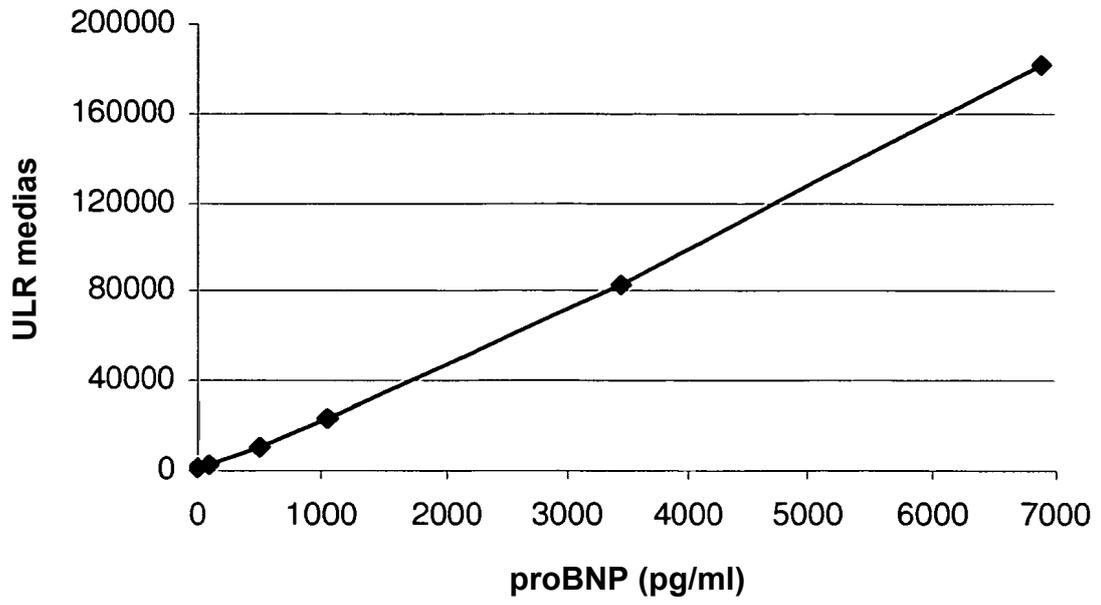


Figura 3

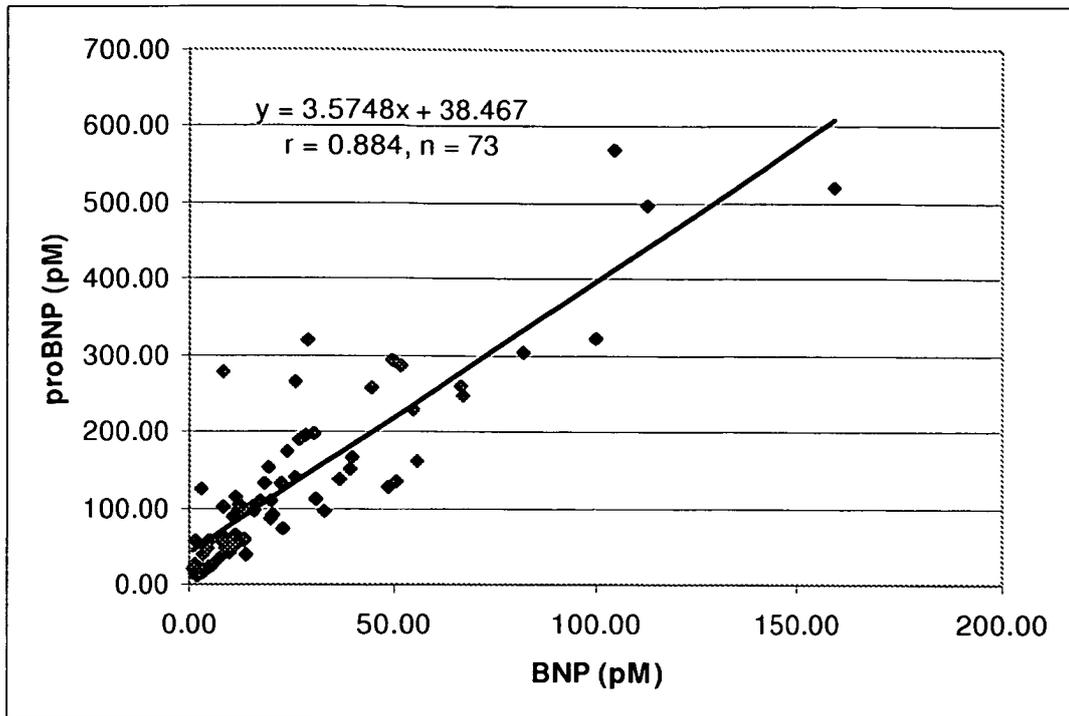


Figura 4