

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 867**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2010 E 10781782 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2502070**

54 Título: **Ensayos para el nt-pro-peptido natriurético de tipo b humano, el pro-peptido natriurético de tipo b humano y el péptido natriurético de tipo b humano**

30 Prioridad:

**21.11.2009 US 623405**

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

**07.01.2014**

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)  
1 North Waukegan Road  
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**KONRATH, JOHN G. y  
MOORE, JEFF A.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 436 867 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

Ensayos para el nt-pro-péptido natriurético de tipo b humano, el pro-péptido natriurético de tipo b humano y el péptido natriurético de tipo b humano

5

**Campo técnico**

En un aspecto, la presente desvelación se refiere a ensayos para detectar y/o cuantificar la cantidad de nt-pro-péptido natriurético de tipo B humano, de pro-péptido natriurético de tipo B humano y de péptido natriurético de tipo B humano en alícuotas obtenidas a partir de una muestra de prueba. En otro aspecto, la presente desvelación se refiere a reactivos inmunodiagnósticos para su uso en un ensayo para detectar y/o cuantificar la cantidad de nt-pro-péptido natriurético de tipo b humano, de pro-péptido natriurético de tipo b humano y de péptido natriurético de tipo b humano en una muestra de prueba. Aun en otro aspecto más, la presente desvelación se refiere a kits para su uso en la realización de un ensayo para detectar y/o cuantificar la cantidad de nt-pro-péptido natriurético de tipo b humano, de pro-péptido natriurético de tipo b humano y de péptido natriurético de tipo b humano en una muestra de prueba.

10

15

**Antecedentes**

El péptido natriurético atrial (en lo sucesivo "ANP"), el péptido natriurético de tipo B (en lo sucesivo "BNP"), el péptido natriurético de tipo C (en lo sucesivo "CNP") y el péptido natriurético Dendroaspis (en lo sucesivo "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 miocárdicas, mientras que el CNP tiene su origen en las células endoteliales. El DNP se aisló del veneno de la serpiente mamba verde y posee una similitud estructural con el ANP, el BNP y el CNP.

20

25

El ANP es secretado por el corazón en las aurículas. El ANP tiene un anillo de 17 aminoácidos cerrado por un puente de disulfuro entre dos residuos de cisteína. Once de los diecisiete aminoácidos del anillo están conservados en el ANP, el BNP, el CNP y el DNP. Además de la estructura anular de 17 aminoácidos, el ANP tiene una cola amino-terminal de 6 aminoácidos y una cola carboxi-terminal de 5 aminoácidos. El ANP es producido en forma de un pro-ANP de 126 aminoácidos que es la principal forma de almacenamiento del ANP. Después de la escisión proteolítica entre los aminoácidos 98 y 99, el péptido maduro de ANP de 28 aminoácidos se encuentra en el plasma sinusal coronario (Véase Yandle, J. Internal Med., 235: 561 - 576 (1994)).

30

35

El BNP recibe su nombre debido a que se aisló por primera vez a partir de cerebro porcino, por lo que inicialmente, "BNP" significaba "péptido natriurético cerebral". Sin embargo, debido a que se averiguó que el BNP pertenecía al sistema natriurético cardíaco, la palabra "cerebral" se modificó por "de tipo B". Por lo tanto, "BNP" se refiere ahora a "péptido natriurético de tipo B". En los seres humanos, el BNP es secretado por el corazón a través del seno coronario, predominantemente desde los ventrículos cardíacos. El precursor pre-pro-péptido del BNP humano (en lo sucesivo, "pre-proBNP humano") tiene 134 aminoácidos de longitud (ID. SEC. Nº: 1) que comprende un péptido de señalización corto, que es escindido enzimáticamente para liberar el pro-péptido humano del BNP (en lo sucesivo "proBNP humano") que tiene 108 aminoácidos de longitud (ID. SEC. Nº: 2). El proBNP humano es adicionalmente escindido en un pro-péptido N-terminal del BNP humano (en lo sucesivo "NT-proBNP humano") que tiene 76 aminoácidos de longitud (ID. SEC. Nº: 3) y la hormona activa, el BNP humano (en lo sucesivo "hBNP" o "hBNP-32"), que tiene 32 aminoácidos de longitud (ID. SEC. Nº: 4). Se ha sugerido que cada uno de los NT-pro-BNP, hBNP-32 y proBNP humanos pueden circular en el plasma humano (véase, Tateyama y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 185: 760 - 7 (1992); Hunt y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 1175 - 83 (1995)).

40

45

El CNP se encontró por primera vez en el cerebro, sin embargo, en su mayor parte se origina en las células endoteliales y renales. Está ampliamente distribuido en la vasculatura, el cerebro, el hueso y el endotelio. Hay poco, si lo hay, CNP presente en el corazón. El pro-CNP es un péptido de 103 aminoácidos que es procesado bien en el CNP-53 (aminoácidos 51 a 103) o bien en el CNP-22 (aminoácidos 82 a 103), que son los péptidos activos. Al igual que el ANP, el CNP tiene un anillo de 17 aminoácidos cerrado por un puente de disulfuro entre residuos de cisteína. Además de esta estructura anular de 17 aminoácidos, el CNP-22 tiene una cola amino-terminal de 5 aminoácidos y no contiene una cola carboxi-terminal. El CNP-53 es idéntico al CNP-22 excepto por una extensión de 31 aminoácidos en el extremo amino-terminal.

50

55

Como se ha mencionado previamente, el DNP se aisló a partir del veneno de la serpiente mamba verde. La forma madura del DNP está formada por 38 aminoácidos. Se ha informado de una inmunorreactividad de tipo DNP (DNP-LI) en plasma humano, y se ha averiguado que la concentración plasmática de DNP-LI está elevada en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (véase, Cataliotti, y col., Mayo Clin. Proc., 76: 111 - 1119 (2001)). Adicionalmente, también se sabe que la infusión de DNP sintético da como resultado una notable natriuresis y diuresis en asociación con un aumento del monofosfato de guanosina cíclico en plasma y orina. *Id.*

60

65

En los seres humanos, una cardiopatía puede estimular la secreción de ANP y de BNP. De hecho, la secreción de

ANP y de BNP en seres humanos refleja típicamente un cambio en la función cardíaca. Específicamente, la secreción de ANP está típicamente acelerada cuando la aurícula sufre una carga, mientras que la biosíntesis y la secreción de BNP se estimulan cuando el ventrículo sufre una carga. Por consiguiente, tanto el ANP como el BNP son útiles como indicadores en el diagnóstico de cardiopatía. Sin embargo, a pesar de esto y con el tiempo, el BNP se ha reconocido como un indicador útil en el diagnóstico de cardiopatía, más que el ANP. Por ejemplo, la concentración sanguínea del BNP es sólo de 1/6 de la del ANP en un sujeto normal, pero llega a ser superior a la del ANP en pacientes con insuficiencia cardíaca. Además, la concentración sanguínea del BNP aumenta en el caso de insuficiencia cardíaca, al igual que la del ANP, la concentración plasmática del BNP a menudo excede la del ANP, reflejando así de forma más precisa la gravedad de la alteración cardíaca. Además, el nivel de BNP en pacientes con insuficiencia cardíaca aumenta a menudo entre varias decenas hasta varias centenas el de los sujetos sanos normales.

Se sabe que el proBNP humano, el NT-proBNP humano y el hBNP pueden circular y pueden ser detectados en muestras de prueba de pacientes que padecen una patología cardiovascular, particularmente insuficiencia cardíaca. Tanto el hBNP como el NT-proBNP humano se usan frecuentemente como marcadores para detectar una insuficiencia cardíaca y para evaluar el riesgo de la misma en pacientes. Sin embargo, la cantidad real de cada una de las formas individuales del BNP (es decir, el proBNP humano, el NT-proBNP humano y el BNP humano) que circula es dudosa debido a las reactividades cruzadas de los ensayos comerciales actuales para estas diversas formas (véase, Liang F., y col., J. American College of Cardiology, 49 (10): 1071 - 1078 (2007)).

Adicionalmente, se sabe que el proBNP humano y el NT-proBNP humano pueden estar glucosilados (véase, Schellenberger, U. y col., Archives of Biochemistry and Biophysics, 451: 160 - 166 (2006)), y estas formas glucosiladas han sido aisladas a partir de muestras humanas (véase, Hammerer- Lercher A., y col., Clinical Chemistry, 54 (5): 858 - 865 (2008) y Seferian, K. y col., Clinical Chemistry, 54 (5): 866 - 873 (2008)). Existen siete posibles sitios de glucosilación confinados en una región de 36 aminoácidos dentro de la porción N-terminal del péptido (desde el aminoácido 36 hasta el 71). Los anticuerpos generados contra esta región pueden unirse o no a las muestras que contienen el analito proBNP o NT-proBNP humanos, dependiendo de: 1) el inmunógeno usado para crear el anticuerpo; y 2) si el analito está o no glucosilado. Los ensayos funcionales para el proBNP y el NT-proBNP humanos deberían usar anticuerpos que eviten estas regiones.

En vista de lo cual, existe una necesidad de la técnica de nuevos ensayos que sean capaces de cuantificar simultáneamente la cantidad de NT-proBNP humano, de proBNP humano y de BNP humano en una muestra de prueba. La presente desvelación persigue proporcionar nuevos ensayos y procedimientos. La presente desvelación también persigue proporcionar un kit para su uso en dichos ensayos y procedimientos. Los procedimientos y el kit pueden usarse en ensayos cualitativos o cuantitativos para el NT-proBNP humano, el proBNP humano y el BNP humano. Estos y otros objetos y ventajas, así como otras características adicionales, serán apreciables a partir de la descripción detallada proporcionada en este documento.

## Resumen

En una forma de realización, la presente desvelación se refiere a un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano"), de pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") y de péptido natriurético cerebral humano ("hBNP") en una muestra de prueba que se está ensayando o que se sospecha que contiene el NT-proBNP humano, el proBNP humano y el hBNP. El procedimiento comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra de prueba (tal como, por ejemplo, una alícuota derivada u obtenida a partir de una muestra de prueba) con (i) un primer anticuerpo de captura que se une al NT-proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un primer anticuerpo inmovilizado y formar una primera mezcla que comprende un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano; (ii) un segundo anticuerpo de captura que se une al proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un segundo anticuerpo inmovilizado y formar una segunda mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano; y (iii) el segundo anticuerpo de captura, que además de unirse al proBNP humano también se une al hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un tercer anticuerpo inmovilizado y formar una tercera mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP humano, en el que dicho primer anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 15F11 y el segundo anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 8.1;

(b) poner en contacto dicha primera mezcla que comprende el complejo del primer anticuerpo de captura-NTproBNP humano con un primer anticuerpo de detección que se une al NT-proBNP humano y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primer anticuerpo de detección, en el que el primer anticuerpo de detección 15C4;

(c) poner en contacto dicha según la mezcla que comprende el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano con el primer anticuerpo de detección que, además de unirse al NT-proBNP humano, también se une al proBNP humano, y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una quinta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primer anticuerpo de detección,

en el que el primer anticuerpo de detección 15C4;

(d) poner en contacto dicha tercera mezcla que comprende el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP humano con un segundo anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una sexta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección, en el que el segundo anticuerpo de detección es el anticuerpo 201.3;

(e) determinar la cantidad de (i) el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección formado en la etapa (b) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de NT-proBNP humano contenido en la muestra de prueba; (ii) el complejo segundo de anticuerpo de captura-proBNP humano-primero anticuerpo de detección formado en la etapa (c) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de proBNP humano contenido en la muestra de prueba; y (iii) el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección formado en la etapa (d) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de prueba.

Alternativamente, en el procedimiento anterior, puede ponerse en contacto una primera alícuota obtenida o derivada de la muestra de prueba con el primer anticuerpo de captura para formar el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano. Puede ponerse en contacto una segunda alícuota obtenida o derivada de la muestra de prueba con el segundo anticuerpo de captura para formar el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano. Puede ponerse en contacto una tercera alícuota obtenida o derivada de la muestra de prueba con el segundo anticuerpo de captura para formar el complejo del segundo anticuerpo-hBNP.

En el inmunoensayo anterior, la fase sólida se elige de entre el grupo que consiste en una partícula magnética, una microesfera, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula estructural, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.

En el inmunoensayo anterior, el marcador detectable del primer anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa. El marcador detectable del segundo anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa.

En otro aspecto, del inmunoensayo de la presente desvelación se refiere a un procedimiento para cuantificar la cantidad de NT-proBNP humano, de proBNP humano y de hBNP en una muestra de prueba que se va a ensayar o que se sospecha que contiene el NT-proBNP humano, el proBNP humano y el hBNP. El procedimiento comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra de prueba con (i) un primer anticuerpo de detección que se une al NT-proBNP humano y que ha sido con un marcador detectable para formar una primera mezcla que comprende un complejo de NT-proBNP-primero anticuerpo de detección; (ii) el primer anticuerpo de detección que, además de unirse al NT-proBNP humano, también se une al proBNP humano y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una segunda mezcla que comprende un complejo de proBNP humano-primero anticuerpo de detección; y (iii) un segundo anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar adicionalmente una tercera mezcla que comprende un complejo de hBNP-segundo anticuerpo de detección, en los que el primer anticuerpo de detección es el anticuerpo 15C4 y el segundo anticuerpo de detección es el anticuerpo 201.3;

(b) poner en contacto dicha primera mezcla que comprende el complejo NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección con un primer anticuerpo de captura que se une al NT-proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un primer anticuerpo inmovilizado para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección, en el que dicho primer anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 15F11;

(c) poner en contacto la segunda mezcla que comprende el complejo proBNP humano-primero anticuerpo de detección con un segundo anticuerpo de captura que se une al proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un segundo anticuerpo inmovilizado para formar una quinta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero anticuerpo de detección, en el que dicho segundo anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 8.1;

(d) poner en contacto la tercera mezcla que comprende el complejo hBNP-segundo anticuerpo de detección con un segundo anticuerpo de captura que, además de unirse al proBNP humano también se une al hBNP, y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un tercer anticuerpo inmovilizado para formar una sexta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección; en el que dicho segundo anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 8.1; y

(e) determinar la cantidad de (i) el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección formado en la etapa (b) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de NT-proBNP humano contenido en la muestra de prueba; (ii) el complejo del segundo anticuerpo de captura- proBNP humano-primero anticuerpo de detección formado en la etapa (c) mediante la

detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de proBNP humano contenido en la muestra de prueba; y (iii) el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección formado en la etapa (d) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de prueba.

5 Alternativamente, en el procedimiento anterior, puede ponerse en contacto una primera alícuota obtenida o derivada de la muestra de prueba con el primer anticuerpo de detección para formar el complejo NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección. Puede ponerse en contacto una segunda alícuota obtenida o derivada de la muestra de prueba con el primer anticuerpo de detección para formar el complejo proBNP humano-primero anticuerpo de detección. Puede ponerse en contacto una tercera alícuota obtenida o derivada de la muestra de prueba con el  
10 segundo anticuerpo de detección para formar el complejo hBNP-segundo anticuerpo de detección.

15 En el inmunoensayo anterior, la fase sólida se elige de entre el grupo que consiste en una partícula magnética, una microesfera, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula estructural, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.

20 En el inmunoensayo anterior, el marcador detectable del primer anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa. El marcador detectable del segundo anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa.

25 Aun en otro aspecto más, la presente desvelación se refiere a un reactivo inmunodiagnóstico. Específicamente, el reactivo inmunodiagnóstico de la presente desvelación comprende:

- (a) un primer anticuerpo de captura específico para el NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano");
- 30 (b) un segundo anticuerpo de captura que es específico para cada uno del pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") y del péptido natriurético cerebral humano ("hBNP");
- (c) un primer anticuerpo de detección que es específico para cada uno del NT-proBNP humano y del proBNP humano; y
- (d) un segundo anticuerpo de detección que es específico para el hBNP.

35 Un ejemplo de un primer anticuerpo de captura que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico es el anticuerpo 15F11. Un ejemplo de un segundo anticuerpo de captura que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico es el anticuerpo 8.1.

40 Un ejemplo de un primer anticuerpo de detección que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico es el anticuerpo 15C4. Un ejemplo de un segundo anticuerpo de detección que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico es el anticuerpo 201.3.

45 Aún en otro aspecto más, la presente desvelación se refiere a un kit para su uso en un ensayo para cuantificar o detectar la cantidad de NT-proBNP humano, de proBNP humano y de hBNP en una muestra de prueba, comprendiendo dicho kit:

- (a) instrucciones para realizar el ensayo de la muestra de prueba; y
- (b) reactivos inmunodiagnósticos que comprenden:
  - 50 (i) un primer anticuerpo de captura específico para el NT-proBNP humano;
  - (ii) un segundo anticuerpo de captura que es específico para cada uno de proBNP humano y hBNP;
  - (iii) un primer anticuerpo de detección que es específico para cada uno de NT-proBNP humano y proBNP humano; y
  - (iv) un segundo anticuerpo de detección que es específico para el hBNP.

55 Un ejemplo de un primer anticuerpo de captura que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico en el anterior kit es el anticuerpo 15F11. Un ejemplo de un segundo anticuerpo de captura que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico en el anterior kit es el anticuerpo 8.1.

60 Un ejemplo de un primer anticuerpo de detección que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico en el anterior kit es el anticuerpo 15C4. Un ejemplo de un segundo anticuerpo de detección que puede usarse como un reactivo inmunodiagnóstico en el anterior kit es el anticuerpo 201.3.

## Descripción de las figuras

Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran los resultados del inmunoensayo de la presente desvelación según se describe en el Ejemplo 1. Las Figuras 2A y 2B muestran los epítomos detectados mediante el uso del inmunoensayo de la presente desvelación según se describe en el Ejemplo 1.

## Descripción detallada

La presente desvelación se refiere a inmunoensayos para la detección o la cuantificación simultánea de la cantidad de: (1) NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano"); (2) pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano"); y (3) péptido natriurético de tipo B humano ("hBNP") presentes en una muestra de prueba que se está ensayando o que se sospecha que contiene NT-proBNP humano, proBNP humano y hBNP. En otra forma de realización más, la presente desvelación se refiere a reactivos inmunodiagnósticos que comprenden al menos un primer anticuerpo de captura específico para el NT-proBNP humano; al menos un segundo anticuerpo que es específico para cada uno de proBNP humano y hBNP, al menos un primer anticuerpo de detección que es específico para cada uno de NT-proBNP humano y proBNP humano y al menos un segundo anticuerpo de detección que es específico para el hBNP. En otra forma de realización más, la presente desvelación se refiere a un kit para la realización de un inmunoensayo. Dichos kits pueden comprender instrucciones para realizar dicho inmunoensayo y los reactivos inmunodiagnósticos descritos anteriormente.

### A. Definiciones

Según se usa en este documento, las formas singulares de "un", "uno" y "el/la" incluyen los referentes plurales salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Para la lectura de los intervalos numéricos de este documento, se contempla explícitamente cada número que interviene en ellos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 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.

#### a) Anticuerpo

Según se usa en este documento, 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 pájaro (por ejemplo, un pato o un ganso), en otro aspecto, un tiburón o una ballena, 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, hámsteres, un cobaya, un gato, un perro, una rata, un ratón, etc) y un primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomólogo, un chimpancé, etc)), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena individual (scFv), anticuerpos de cadena individual, anticuerpos de dominio individual, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos Fab", Fvs (sdFv) unidos por disulfuro y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra los anticuerpos de la presente desvelación), y fragmentos de unión al epítomo 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 al 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) 15C4

Según se usa en este documento, el término "15C4" se refiere a un anticuerpo monoclonal de IgG1 que está disponible en HyTest (Turku, Finlandia) (nº de catálogo 4NT1) que se une a los residuos de aminoácidos 63 - 71 de la ID. SEC. N°: 3.

#### c) 15F11

Según se usa en este documento, el término "15F11" se refiere un anticuerpo monoclonal de IgG2b que está disponible en HyTest (Turku, Finlandia) (nº de catálogo 4NT1) que se une a los residuos de aminoácidos 13 - 24 de la ID. SEC. N°: 3.

#### d) 24E11

Según se usa en este documento, el término "24E11" se refiere a un anticuerpo monoclonal de IgG2a que está disponible en HyTest (Turku, Finlandia) (nº de catálogo 4NT1) que se une a los residuos de aminoácidos 67 - 76 de la ID. SEC. N°: 3.

#### e) 8.1

Según se usa en este documento, "8.1" se refiere a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos

por la línea celular de hibridoma 8.1 que ha sido depositada en la American Type Culture Collection (A.T.C.C.) el 21 de febrero de 1996 y se le ha asignado el número de registro de la A.T.C.C. HB-12056. El 8.1 y los procedimientos para elaborar el 8.1 se describen en la patente de EE.UU. N° 6.162.902. El 8.1 se une a un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos 26 - 32 del hBNP.

5

#### **f) 201.3**

Según se usa en este documento, "201.3" se refiere a un anticuerpo monoclonal o a derivados del mismo producidos por la línea celular de hibridoma 201.3 que ha sido depositada en la A.T.C.C. el 14 de febrero de 1996 y se le ha asignado el número de registro de la A.T.C.C. HB-12045. El 201.3 y los procedimientos para elaborar el 201.3 se describen en la patente de EE.UU. N° 6.162.902. El 201.3 se une a un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos 1 - 10 del hBNP.

10

#### **g) Epítipo**

15

Según se usa en este documento, el término "epítipo" o "epítipos" se refiere a los sitios o a los fragmentos de un polipéptido o de una proteína con actividad antigénica o inmunogénica en un sujeto. Un epítipo con actividad inmunogénica es un sitio o un fragmento de un polipéptido o de una proteína que desencadena una respuesta por anticuerpos en un animal. Un epítipo con actividad antigénica es un sitio o un fragmento de un polipéptido o de una proteína al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo, según se determina mediante cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos.

20

#### **h) Péptido Natriurético Cerebral Humano**

25

Según se usa en este documento, los términos "péptido natriurético cerebral humano", "BNP humano", "hBNP", "hBNP-32", "péptido hBNP", "polipéptido hBNP" o "péptido natriurético de tipo B", usados de forma intercambiable en este documento, se refieren a una molécula de 32 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 4. La secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 4 está representada por los residuos de aminoácidos 77 - 108 de la secuencia de 108 aminoácidos del proBNP humano (ID. SEC. N°: 2).

30

#### **i) Reactivo inmunodiagnóstico**

Según se usa en este documento, el término "reactivo inmunodiagnóstico" se refiere a uno o más anticuerpos que se unen específicamente a una región (por ejemplo, un epítipo) del NT-proBNP humano, (2) del proBNP humano, (3) del BNP humano, o (4) cualquier combinación de (1), (2) o (3).

35

#### **j) Pre-Pro-Péptido Precursor del BNP Humano**

Según se usa en este documento, el término "pre-pro-péptido precursor del BNP humano" o "pre-proBNP humano" se refiere a una molécula de 134 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1.

40

#### **k) Pro-Péptido Natriurético de tipo B Humano**

Según se usa en este documento, la frase "pro-péptido natriurético de tipo B humano" o "proBNP humano" se refiere a una molécula de 108 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2. El proBNP humano deriva del pre-proBNP humano.

45

#### **l) Pro-Péptido Natriurético de tipo B Humano N-Terminal**

Según se usa en este documento, la frase "pro-péptido natriurético de tipo B humano N-terminal" o "NT-proBNP humano", se refiere a una molécula de 76 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 3. El NT-proBNP humano deriva del proBNP humano (ID. SEC. N°: 2).

50

#### **m) Sujeto**

55

Según se usa en este documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable, aunque un sujeto de la desvelación de este documento no tiene por qué experimentar o haber experimentado necesariamente un tratamiento médico en el momento del inmunoensayo. Según se usa en este documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, en un aspecto, un pájaro (por ejemplo, un pato o un ganso), en otro aspecto, un tiburón o una ballena, o en otro aspecto adicional, un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, hámsteres, un cobaya, un gato, un perro, una rata, un ratón, etc.) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomólogo, un chimpancé y un ser humano). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

60

#### **n) Muestra de Prueba**

65

Según se usa en este documento, el término "muestra de prueba" se refiere a una muestra biológica derivada de tejidos, suero, plasma, sangre completa, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina u otros fluidos corporales de un sujeto en los que se está ensayando, y/o que se sospecha que contienen, NT-proBNP humano, proBNP y hBNP. La muestra de prueba puede prepararse mediante el uso de técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica.

## **B. Inmunoensayos y reactivos inmunodiagnósticos**

Como se ha mencionado brevemente en este documento, en una forma de realización, la presente desvelación se refiere a inmunoensayos para la simultánea detección cualitativa y/o cuantificación de (1) NT-proBNP humano; (2) proBNP humano; y (3) hBNP, en una muestra de prueba. Los inmunoensayos de la presente desvelación proporcionan varios beneficios. En primer lugar, los inmunoensayos de la presente desvelación permiten la detección simultánea y específica de (1) NT-proBNP humano; (2) proBNP humano; y (3) hBNP en una muestra de prueba. En segundo lugar, los inmunoensayos de la presente desvelación permiten la evaluación de (1) NT-proBNP humano; (2) proBNP humano; y (3) hBNP, tanto individualmente como el uno respecto del otro en la misma muestra de prueba (o única) (las alícuotas derivadas u obtenidas a partir de una única muestra de prueba pueden usarse en los procedimientos de la presente invención). En tercer lugar, los inmunoensayos de la presente desvelación sólo requieren dos anticuerpos de captura y dos anticuerpos de detección para detectar tres analitos diferentes (a saber, (1) NT-proBNP humano; (2) proBNP humano; y (3) hBNP) en una muestra de prueba, reduciendo así el coste relacionado con la realización de dicho inmunoensayo.

Los inmunoensayos de la presente desvelación pueden realizarse mediante el uso de cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no se limita a, un formato en sándwich. Además, los inmunoensayos de la presente desvelación se realizan en múltiples recipientes de reacción. En un ejemplo de formato, los inmunoensayos de la presente desvelación se realizan en tres recipientes de reacción por separado. En otras palabras, el inmunoensayo para el NT-proBNP humano se realiza en un recipiente de reacción, el inmunoensayo para el proBNP humano se realiza en un recipiente de reacción (que sería un segundo recipiente de reacción) y el inmunoensayo para el hBNP se realiza en un recipiente de reacción (que sería un tercer recipiente de reacción).

En ciertas formas de realización de la presente desvelación se emplean dos anticuerpos de captura y dos anticuerpos de detección para separar y cuantificar (1) el NT-proBNP humano; (2) el proBNP humano; y (3) el hBNP, en una muestra de prueba. Más específicamente, dos anticuerpos de captura y dos anticuerpos de detección se unen a ciertos epítomos de (1) el NT-proBNP humano; (2) el proBNP humano; y (3) el hBNP, formando complejos inmunitarios "en sándwich". Generalmente, en los inmunoensayos se usan dos anticuerpos para capturar (1) el NT-proBNP humano; (2) el proBNP humano; y (3) el hBNP, en la muestra de prueba (estos anticuerpos se denominan frecuentemente anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura"), y se usan dos anticuerpos para unir un marcador detectable (a saber, cuantificable) al sándwich (estos anticuerpos se denominan frecuentemente "anticuerpo de detección", "anticuerpos de detección", "conjugado" o "conjugados").

Los inventores han descubierto que pueden realizarse excelentes inmunoensayos, particularmente, ensayos en sándwich, mediante el uso de ciertas combinaciones de anticuerpos, como anticuerpos de captura y de detección. Más específicamente, se usa un primer anticuerpo de captura que se une al NT-proBNP humano. Un ejemplo de dicho anticuerpo que puede usarse como el primer anticuerpo de captura es el anticuerpo 15F11. Además, también se usa un segundo anticuerpo de captura que se une a cada uno de (1) el proBNP humano; y (2) el hBNP. Un ejemplo de un segundo anticuerpo de captura que puede usarse es el anticuerpo 8.1.

Como se mencionó previamente en este documento, se usan dos anticuerpos de detección en la presente desvelación. El primer anticuerpo de detección se une a cada uno de (1) el NT-proBNP humano; y (2) el proBNP humano. Un ejemplo de un primer anticuerpo de detección que puede usarse es el anticuerpo 15C4. Además, el segundo anticuerpo de detección es un anticuerpo que se une al hBNP. Un ejemplo de un segundo anticuerpo de detección que puede usarse es el anticuerpo 201.3.

La muestra de prueba que se está ensayando (por ejemplo, que se sospecha que contiene) (1) el NT-proBNP humano; (2) el proBNP humano; y (3) el hBNP, puede ponerse en contacto con los dos anticuerpos de captura y los dos anticuerpos de detección bien simultáneamente o bien secuencialmente y en cualquier orden. Alternativamente, puede ensayarse cualquier número de alícuotas derivadas de la muestra de prueba (tal como, pero no se limita a, al menos tres (3) alícuotas derivadas de la muestra de prueba). Por ejemplo, la muestra de prueba puede ponerse en contacto en primer lugar con al menos un anticuerpo de captura, y después (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de detección. Alternativamente, la muestra de prueba puede ponerse en contacto en primer lugar con al menos un anticuerpo de detección, y después (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de captura. En otra alternativa más, la muestra de prueba puede ponerse en contacto simultáneamente con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección.

En el formato de ensayo en sándwich, se pone en contacto en primer lugar una muestra de prueba que se sospecha que contiene (1) el NT-proBNP humano; (2) el proBNP humano y (3) el hBNP, con los anteriormente descritos dos anticuerpos de captura en unas condiciones que permitan la formación de los siguientes complejos: (a) un complejo

del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano (tal como en una primera mezcla); (b) un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano (tal como en una segunda mezcla); y (c) un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP (tal como en una tercera mezcla). Pueden usarse alícuotas individuales (por ejemplo, al menos tres alícuotas) de la muestra de prueba para formar el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano, el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano y el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP. Como se mencionó previamente en este documento, se usa al menos un primer anticuerpo de captura que se une al NT-proBNP humano. Un ejemplo de dicho primer anticuerpo de captura es 15F11. El segundo anticuerpo de captura se une a cada uno de (1) proBNP humano; y (2) hBNP. Un ejemplo de dicho segundo anticuerpo de captura es el anticuerpo 8.1. El orden en el que los anticuerpos de captura se ponen en contacto con la muestra de prueba para formar los complejos descritos anteriormente no es crítico. Alternativamente, la muestra de prueba puede ponerse en contacto simultáneamente con cada uno de los anticuerpos de captura (en recipientes de reacción individuales). En un ensayo en sándwich, se usan los anticuerpos, preferiblemente, los dos anticuerpos de captura, en unas cantidades en exceso molar de la cantidad máxima de (1) NT-proBNP humano; (2) proBNP humano; y (3) hBNP, esperada en la muestra de prueba. Por ejemplo, pueden usarse desde aproximadamente 5 µg/ml hasta aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por ml de tampón (por ejemplo, tampón de recubrimiento de micropartículas).

Opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra de prueba con los dos anticuerpos de captura, puede unirse al menos uno de los anticuerpos de captura sobre un soporte sólido, lo que facilita la separación de los complejos descritos anteriormente (a saber, (a) un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano; (b) un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano; y (c) un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP) a partir de la muestra de prueba. Aún más opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra de prueba con los dos anticuerpos de captura, pueden unirse todos los anticuerpos de captura sobre un soporte sólido, lo que facilita la separación de los complejos descritos anteriormente (a saber, (a) un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano; (b) un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano; y (c) un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP) a partir de la muestra de prueba. Puede usarse cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo, pero no se limita a, soportes sólidos elaborados con materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o microesferas. Los anticuerpos pueden unirse al soporte sólido mediante adsorción, mediante una unión covalente usando un agente de acoplamiento químico o mediante otro medio conocido en la técnica, con la condición de que dicha unión no interfiera en la capacidad del anticuerpo para unirse a (1) el NT-proBNP humano (2) el proBNP humano; y (3) el hBNP. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse a micropartículas que previamente se han recubierto con estreptavidina (por ejemplo, usando micropartículas recubiertas con estreptavidina Power-Bind™-SA-MP, disponibles en Seradyn, Indianápolis, Indiana). Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse mediante el uso de micropartículas que han sido recubiertas previamente con anticuerpos monoclonales específicos anti-especie. Además, si fuera necesario, el soporte sólido puede estar derivatizado para permitir la reactividad con diversos grupos funcionales del anticuerpo. Dicha derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, pero no se limitan a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-metil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

Después de que la muestra de prueba que se está ensayando y/o que se sospecha que contiene (1) el NT-proBNP humano; (2) el proBNP humano; y (3) el hBNP se pone en contacto con los dos anticuerpos de captura, las mezclas se incuban con objeto de permitir la formación de una mezcla que contiene al menos los siguientes complejos: (a) un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano (la primera mezcla); (b) un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano (la segunda mezcla); y (c) un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP (la tercera mezcla). La incubación puede realizarse a un pH de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 10,0, a una temperatura desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 45°C, y durante un periodo de al menos aproximadamente un (1) minuto hasta aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta 20 minutos, muy preferiblemente entre aproximadamente 2 - 4 minutos. El inmunoensayo descrito en este documento puede realizarse en una etapa (lo que significa que la muestra de prueba, al menos tres anticuerpos de captura y al menos tres anticuerpos de detección se añaden todos secuencial o simultáneamente a un recipiente de reacción), o en más de una etapa, tal como en dos etapas, en tres etapas, etc.

Después de la formación de las mezclas que contienen el complejo del primer anticuerpo de captura -NT-proBNP humano, el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano y un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP, los complejos se ponen en contacto entonces con dos anticuerpos de detección en unas condiciones que permitan la formación de un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección (formando así una cuarta mezcla), un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero anticuerpo de detección (formando así una quinta mezcla) y un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección (formando así una sexta mezcla). El anticuerpo de detección usado para detectar el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano y el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano son idénticos entre sí. Al igual que con el anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), cuando el primer anticuerpo de detección se pone en contacto con el complejo de anticuerpo de captura-NT-proBNP humano, el primer anticuerpo de detección se pone en contacto con el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano y el segundo anticuerpo de detección se pone en contacto con el complejo del anticuerpo de captura-hBNP, se requiere un periodo de incubación en unas condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación del complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero

anticuerpo de detección, un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero detección, un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, al menos uno de los dos anticuerpos de detección contiene un marcador detectable. Más preferiblemente, ambos anticuerpos de detección contienen un marcador detectable. El marcador detectable puede unirse a al menos un anticuerpo de detección (por ejemplo, el primer anticuerpo de detección) antes de, simultáneamente o después de la formación del complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección. Puede usarse cualquier marcador detectable conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador radioactivo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ , un marcador enzimático, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato, etc., un marcador quimioluminiscente, tal como ésteres de acridinio, luminol, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc. Un marcador fluorescente, tal como fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'-carboxifluoresceína, 5 (6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclaro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (seleniuro de cadmio protegido por sulfuro de cinc), un marcador termométrico o un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa. Una introducción sobre marcadores, procedimientos de marcaje y detección de marcadores se encuentra 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, puede usarse más de un marcador. Por ejemplo, pueden usarse conjugados dobles, cada uno de los cuales contiene diferentes marcadores. Por ejemplo, un anticuerpo conjugado puede contener biotina y el segundo conjugado puede ser un anticuerpo anti-biotina marcado con acridinio. El experto habitual en la técnica reconocería fácilmente otras variaciones.

El marcador detectable puede unirse a los anticuerpos bien directamente o bien a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que puede usarse es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, clorhidrato) que está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Otros agentes de acoplamiento que pueden usarse son conocidos en la técnica. Los procedimientos para unir un marcador detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Adicionalmente, pueden adquirirse o sintetizarse muchos marcadores detectables que ya contienen grupos terminales que facilitan el acoplamiento del marcador detectable al anticuerpo, tales como ésteres activos de N10-(3-sulfopropil)-N-(3-carboxipropil)-acridinio-9-carboxamida, también conocido como Éster de CPSP-Acridinio, o éster activo de N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida, también conocido como Éster de SPSP-Acridinio.

Cualquiera o todos del complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección, del complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero detección, del complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección pueden estar, pero no tienen por qué, separados del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación del marcador. Por ejemplo, si el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura) está unido sobre un soporte sólido, tal como un pocillo o una microesfera, la separación puede realizarse eliminando el fluido (de la muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Alternativamente, si el primer anticuerpo de captura está unido sobre un soporte sólido, puede ponerse en contacto simultáneamente con la muestra que contiene el NT-proBNP-humano y el primer anticuerpo de detección para formar un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo, seguido de la eliminación del fluido (muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Si el primer anticuerpo de captura no está unido sobre un soporte sólido, entonces el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección no tiene que ser eliminado de la muestra de prueba para la cuantificación de la cantidad de marcador. Alternativamente, si el segundo anticuerpo de captura está unido sobre un soporte sólido, puede ponerse en contacto simultáneamente con la muestra que contiene el proBNP humano de captura y el primer anticuerpo de detección para formar un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-segundo anticuerpo complejo, seguido de la eliminación del fluido (muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Si el segundo anticuerpo de captura no está unido sobre un soporte sólido, entonces el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero anticuerpo de detección no tiene que ser eliminado de la muestra de prueba para la cuantificación de la cantidad de marcador. Alternativamente, si el segundo anticuerpo de captura está unido sobre un soporte sólido, puede ponerse en contacto simultáneamente con la muestra que contiene el hBNP y un segundo anticuerpo de detección para formar un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo, seguido de la eliminación del fluido (muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Si el al menos un segundo anticuerpo de captura no está unido a un soporte sólido, entonces el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección no tiene que ser eliminado de la muestra de prueba para la cuantificación de la cantidad de marcador.

Después de la formación del complejo marcado del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección, el complejo marcado del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero anticuerpo de detección y el complejo marcado del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección, se cuantifica la cantidad de marcador en cada uno de los complejos (y por lo tanto, en cada una de las cuarta, quinta y sexta mezclas) mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, si se usa un marcador enzimático, el complejo marcado se hace reaccionar con un sustrato del marcador que proporciona una reacción cuantificable, tal como la aparición de color. Si el marcador es un marcador radioactivo, el marcador se cuantifica mediante el uso de un contador de centelleo. Si el marcador es un marcador fluorescente, el marcador se cuantifica mediante la

estimulación del marcador con una luz de un color (lo que se conoce como "longitud de onda de excitación") y se detecta otro color (lo que se conoce como "longitud de onda de emisión") que es emitida por el marcador en respuesta a la estimulación. Si el marcador es un marcador quimioluminiscente, el marcador se cuantifica mediante la detección de la luz emitida, ya sea visualmente o mediante el uso de luminómetros, de una película de rayos X, de una película fotográfica de alta velocidad, de una cámara CCD, etc. Una vez cuantificada la cantidad de marcador en el complejo, se determina la concentración de NT-proBNP humano, de proBNP humano y de hBNP en la muestra de prueba mediante el uso de una curva estándar que ha sido generada mediante el uso de diluciones sucesivas de NT-proBNP humano, de un proBNP humano o de un hBNP humano de concentraciones conocidas. Además del uso de diluciones sucesivas de NT-proBNP humano, de proBNP humano o de hBNP, la curva estándar puede generarse gravimétricamente, mediante espectroscopía de masas y mediante otras técnicas conocidas en la técnica.

En otra forma de realización, la presente desvelación se refiere a reactivos inmunodiagnósticos. Específicamente, el al menos un anticuerpo de captura (a saber, un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 13 - 24 de la ID. SEC. N°: 3) y al menos un anticuerpo de detección (a saber, un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 63 - 71 de la ID. SEC. N°: 3 o en los residuos de aminoácidos 67 - 76 de la ID. SEC. N°: 3) descritos en este documento pueden usarse individualmente o combinados, como uno o más reactivos inmunodiagnósticos en uno o más inmunoensayos, tales como los descritos anteriormente. Cuando el al menos un anticuerpo de captura y el al menos un anticuerpo de detección descritos en este documento se usan conjuntamente en un inmunoensayo (tal como los descritos previamente en este documento), el inmunoensayo muestra una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 1,0% con cualquier proBNP humano en una muestra de prueba. Más específicamente, el inmunoensayo muestra menos de aproximadamente el 0,9%, menos de aproximadamente el 0,8%, menos de aproximadamente el 0,7%, menos de aproximadamente el 0,6%, menos de aproximadamente el 0,5%, menos de aproximadamente el 0,4%, menos de aproximadamente el 0,3%, menos de aproximadamente el 0,2%, menos de aproximadamente el 0,1% o menos de aproximadamente el 0,001% con cualquier proBNP humano que pueda estar presente en la muestra de prueba.

Alternativamente, al menos un anticuerpo de captura (a saber, un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 103 - 108 de la ID. SEC. N°: 2) y al menos un anticuerpo de detección (a saber, un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 63 - 71 de la ID. SEC. N°: 2) descritos en este documento pueden usarse individualmente o combinados, como uno o más reactivos inmunodiagnósticos en uno o más inmunoensayos, tales como los descritos anteriormente.

Alternativamente, al menos un anticuerpo de captura (a saber, un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 28 - 32 de la ID. SEC. N°: 4) y al menos un anticuerpo de detección (a saber, un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o que consiste en 1 - 10 de la ID. SEC. N°: 4) descritos en este documento pueden usarse individualmente o combinados, como uno o más reactivos inmunodiagnósticos en uno o más inmunoensayos, tales como los descritos anteriormente.

### **C. Adaptaciones de los procedimientos**

La divulgación de este documento también puede adaptarse para su uso en diversos sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquellos en los que la fase sólida comprende una micropartícula), según se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°s 5.089.424 y 5.006.309, y, por ejemplo, según se comercializan por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluyendo, pero no limitándose a, los instrumentos ARCHITECT®, AxSYM®, IMx®, PRISM® y Quantum™ II de Abbott, así como otras plataformas. Además, la desvelación es opcionalmente adaptable para el sistema de inmunoensayo electroquímico comercial de Abbott Laboratories Point of Care (i-STAT™) para la realización de inmunoensayos en sándwich. Los inmunosensores y sus procedimientos de elaboración y operación en dispositivos de ensayo de uso único se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.063.081, en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2003/0170881, en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2004/0018577, en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2005/0054078 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2006/0160164.

### **D. Ejemplos de Kits**

La presente desvelación de este documento también puede adaptarse para su uso en diversos kits para su uso con sistemas y plataformas automatizados y semiautomatizados, por ejemplo, los comercializados por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluyendo, pero no limitándose a, los instrumentos ARCHITECT®, AxSYM®, IMx®, PRISM®, y Quantum™ II de Abbott Laboratories, el sistema de inmunoensayo electroquímico comercial de Abbott Laboratories Point of Care (i-STAT™) para la realización de inmunoensayos en sándwich, así como otras plataformas.

Dichos kits pueden comprender uno o más de los reactivos inmunodiagnósticos (por ejemplo, los anticuerpos de captura y de detección) descritos en este documento. Más específicamente, si el kit es un kit para la realización de un inmunoensayo, el kit puede contener opcionalmente (1) al menos dos anticuerpos de captura y dos anticuerpos

de detección que se unen al NT-proBNP humano, al proBNP humano y al BNP humano; y (2) una o más instrucciones para la realización del inmunoensayo. Los reactivos inmunodiagnósticos de la presente desvelación pueden estar incluidos en dicho kit de ensayo como un anticuerpo de captura, como un anticuerpo de detección o ambos, como un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección. Por ejemplo, el anticuerpo 15F11 puede incluirse en el kit como un anticuerpo de captura, y el anticuerpo 15C4 puede incluirse en el kit como un anticuerpo de detección. Alternativamente, el anticuerpo 15F11 puede incluirse en el kit como un anticuerpo de captura y el anticuerpo 24E11 puede incluirse en el kit como un anticuerpo de detección. Opcionalmente, el kit también puede contener al menos un calibrador o un control. Puede incluirse cualquier calibrador o control en el kit. Sin embargo, preferiblemente, el calibrador o el control es el NT-proBNP humano, especialmente la ID. SEC. N°: 3, el proBNP humano, especialmente la ID. SEC. N°: 4, el hBNP, especialmente la ID. SEC. N°: 2 o combinaciones de los mismos, según se describió previamente en este documento. Consecuentemente, los kits pueden comprender al menos un calibrador, o al menos un control, o una combinación de al menos un calibrador y al menos un control.

Opcionalmente, los kits también pueden incluir reactivos para el control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de reactivos para el control de calidad es bien conocida en la técnica, y se describe, por ejemplo, en varios de los prospectos de productos inmunodiagnósticos. Los miembros del panel de sensibilidad del NT-proBNP humano, del proBNP humano, del hBNP o de combinaciones de los mismos pueden prepararse opcionalmente en cantidades variables que contienen, por ejemplo, cantidades conocidas del antígeno NT-proBNP humano, del antígeno proBNP humano, del antígeno hBNP o de combinaciones de los mismos que varían desde "baja" hasta "alta", por ejemplo, mediante la adición de cantidades conocidas del antígeno NT-proBNP humano, de proBNP humano, de hBNP o de combinaciones de los mismos en un tampón de ensayo apropiado (por ejemplo, un tampón de fosfato). Estos miembros del panel de sensibilidad se usan opcionalmente para establecer las características de rendimiento del ensayo, y además opcionalmente son útiles indicadores de la integridad de los reactivos del kit de inmunoensayo, y la estandarización de los ensayos. También pueden emplearse como calibradores el antígeno NT-proBNP humano, el antígeno proBNP humano, el antígeno hBNP o combinaciones de los mismos.

Los anticuerpos proporcionados en el kit pueden incorporar un marcador detectable, tal como un fluoróforo, una fracción radioactiva, una enzima, un marcador de biotina/avidina, un cromóforo, un marcador quimioluminiscente o similares, o el kit puede incluir reactivos para el marcaje de los anticuerpos o de los reactivos para la detección de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de detección) y/o para el marcaje de los antígenos o de los reactivos para la detección del antígeno. Los anticuerpos, los calibradores y/o los controles pueden proporcionarse en recipientes individuales o estar pre-dispensados en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

En otra forma de realización más, el kit puede comprender, ya sea solo, con instrucciones, o con otros aspectos del kit y componentes del kit, un agente inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos elegidos de entre el grupo que consiste en 15F11, 15C4, 8.1, 201.3 y 24E11.

Los kits pueden incluir opcionalmente otros reactivos requeridos para realizar un ensayo diagnóstico o para facilitar evaluaciones de control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, cofactores enzimáticos, sustratos, reactivos de detección, y similares. También pueden incluirse en el kit otros componentes, tales como tampones y disoluciones para el aislamiento y/o el tratamiento de una muestra de prueba (por ejemplo, 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 comprender adicionalmente reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit se proporcionan opcionalmente en recipientes adecuados. Como se indicó anteriormente, uno o más de los recipientes pueden ser una placa de microtitulación. El kit puede incluir adicionalmente recipientes para contener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o un cartucho para una muestra de sangre o de orina). Cuando sea apropiado, el kit también puede contener opcionalmente recipientes de reacción, recipientes de mezcla y otros componentes que faciliten la preparación de los reactivos o de la muestra de prueba. El kit también puede incluir uno o más instrumentos que ayuden a la obtención de una muestra de prueba, tales como una jeringa, una pipeta, unas pinzas, una cuchara de medición o similares.

El kit puede opcionalmente contener además las instrucciones para su uso, que pueden proporcionarse en forma de papel o en una forma legible por ordenador, tal como un disco, un CD, un DVD o similares.

Ahora, a modo de ejemplo, y no de limitación, se proporcionarán algunos ejemplos de la presente desvelación.

#### **Ejemplo 1: detección y cuantificación simultáneas del NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano, del pro-péptido natriurético de tipo B humano y del péptido natriurético de tipo B humano**

##### Materiales, procedimientos y resultados

En este ejemplo se usó un sistema automatizado ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) para realizar los inmunoensayos que cuantificarían el NT-proBNP humano, el proBNP humano y el BNP humano. La detección de estos tres análisis se lleva a cabo mediante el uso de dos tipos de micropartículas magnéticas recubiertas con

anticuerpos monoclonales y de dos tipos de anticuerpos monoclonales marcados.

5 Se ensayaron diluciones del NT-proBNP humano (HyTest, Turku, Finlandia; nº de catálogo 8NT1) que contienen NT-proBNP humano (0,0 pM - 577,4 pM) en NaOAc 10 mM, DTPA 10 mM, BSA al 2%, ProClin 300 al 0,1%, NaN<sub>3</sub> al 0,1%, pH 5,6 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El ensayo se realizó en los recipientes de reacción (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que se usan para los ensayos individuales en el sistema automatizado ARCHITECT®. Todas las etapas descritas tuvieron lugar en el instrumento ARCHITECT®.

10 Se ensayaron diluciones del proBNP humano (HyTest, Turku, Finlandia; nº de catálogo 8PRO8) que contienen proBNP humano (0,0 pM - 577,4 pM) en NaOAc 10 mM, DTPA 10 mM, BSA al 2%, ProClin 300 al 0,1%, NaN<sub>3</sub> al 0,1%, pH 5,6 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El ensayo se realizó en los recipientes de reacción (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que se usan para los ensayos individuales en el sistema automatizado ARCHITECT®. Todas las etapas descritas tuvieron lugar en el instrumento ARCHITECT®.

15 Se ensayaron calibradores del BNP humano Architect BNP (List 8K2802, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.) (0,0 pM - 577,4 pM). El ensayo se realizó en los recipientes de reacción (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que se usan para los ensayos individuales en el sistema automatizado ARCHITECT® de Abbott. Todas las etapas descritas tuvieron lugar en el instrumento ARCHITECT®.

20 Estas muestras se ensayaron mediante el uso de un formato de inmunoensayo tradicional en dos etapas, según se describe. El formato de ensayo en dos etapas se produce en un único recipiente de reacción. El formato de ensayo en dos etapas comprende las etapas de añadir la muestra, añadir las micropartículas magnéticas recubiertas de anticuerpo, unir el analito, lavar los complejos de micropartículas magnéticas-analito, añadir el anticuerpo conjugado marcado, unir el conjugado marcado a los complejos de micropartículas magnéticas-analito, lavar los complejos resultantes de micropartículas magnéticas-analito-anticuerpo conjugado marcado y leer la señal generada por el  
25 marcador complejo remanente en el recipiente de reacción.

#### Detección del BNP humano

30 Cada dilución de la muestra fue dispensada en la cantidad de 100 µl en los recipientes de reacción individuales. Al mismo tiempo se dispensaron micropartículas magnéticas recubiertas con EDAC al 0,10% (50 µl) (Polymer Laboratories Ltd, ahora parte de Varian, Inc., Shropshire, Reino Unido) recubiertas con anticuerpo monoclonal 8.1 anti-BNP humano / proBNP humano (Scios, Sunnyvale, CA; nº de registro de la A.T.C.C. HB-12056) en la cantidad de 50 µl en el mismo recipiente de reacción. El recipiente de reacción se agitó después vorticialmente para mezclar  
35 la muestra y las micropartículas magnéticas. Cada mezcla de reacción se incubó durante 18 minutos a 37°C.

Durante esta incubación, cualquier BNP humano de las muestras fue capturado por el anticuerpo monoclonal 8.1 con el que estaban recubiertas las micropartículas magnéticas.

40 Una vez completada la incubación de 18 minutos, las micropartículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 8.1 y los complejos del anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP se capturaron magnéticamente y se inmovilizaron en un agregado en el lateral del recipiente de reacción. Las micropartículas magnéticas inmovilizadas y el agregado del complejo del anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP se lavaron después aspirando alternativamente el líquido del recipiente, y añadiendo después tampón de lavado del kit de ensayo (tampón de lavado ARCHITECT®,  
45 disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) al recipiente de reacción (1 ml de tampón de lavado, se repitió 4 veces). Este proceso eliminó cualquier BNP humano no unido de la mezcla de reacción. La micropartícula capturada magnéticamente, el BNP humano de los complejos de anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP formado durante la incubación de 18 minutos permaneció en el recipiente de reacción. Entonces se liberó el agregado de micropartícula magnética del complejo de anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP humano.

50 Durante una segunda incubación de 4 minutos, se dispensó anticuerpo monoclonal anti-BNP humano / anti-proBNP humano 201.3 marcado con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park) (Scios, Sunnyvale, CA; nº de registro de la A.T.C.C. HB-12045) en la cantidad de 50 µl en recipientes de reacción individuales que sólo contenían las micropartículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 8.1 y los complejos de anticuerpo monoclonal  
55 8.1 / BNP. Esta mezcla de reacción se agitó después vorticialmente para dispersar el agregado de micropartículas.

Los complejos de micropartículas magnéticas y anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP se incubaron con los anticuerpos monoclonales 201.3 anti-BNP humano marcados con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, Código 88333) en  
60 tampón durante 4 minutos a 37°C. Durante esta incubación, los anticuerpos monoclonales 201.3 anti-BNP humano marcados con acridinio se unieron a los complejos de micropartículas magnéticas / anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP.

Una vez completada la incubación de 4 minutos, los complejos de las micropartículas magnéticas / anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP humano / anticuerpo monoclonal 201.3 marcado y de anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP se capturaron de nuevo magnéticamente en un agregado. El agregado recapturado se lavó después repetidamente con tampón (1 ml), se repitió 4 veces. Entonces se liberaron los agregados de las micropartículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 8.1 capturadas magnéticamente, el BNP humano y el anticuerpo monoclonal marcado 201.3) y del complejo anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP.

Entonces se estimuló el marcador de acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, Código 61444) para que emitiera luz. Esto se consiguió añadiendo un tampón de pH bajo (pH 1) que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,32%) (List 6E23-65, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Este fue dispensado en la cantidad de (100 µl) en recipientes de reacción individuales que contenían los complejos de las micropartículas, y después se agitaron vorticialmente. Esta etapa liberó los anticuerpos monoclonales 201.3 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) anti-BNP humano marcados con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), unidos al BNP humano capturado por las micropartículas.

Entonces las micropartículas magnéticas se capturaron magnéticamente dejando los anticuerpos anti-BNP liberados marcados con acridinio (anticuerpo monoclonal 201.3) en la disolución de la mezcla de reacción. Esto fue seguido por la adición (300 µl) de un tampón de pH 13 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que "estimula" la producción de luz, unidades relativas de luz (RLU), por parte del acridinio que había sido liberado en la disolución. La cantidad de luz que fue generada se usó para determinar la cantidad de BNP humano detectada en la muestra.

#### Detección del ProBNP humano

Cada dilución de la muestra fue dispensada en la cantidad de 100 µl en los recipientes de reacción individuales. Al mismo tiempo se dispensaron micropartículas magnéticas recubiertas con EDAC al 0,10% (50 µl) (Polymer Laboratories Ltd, ahora parte de Varian, Inc., Shropshire, Reino Unido) recubiertas con anticuerpo monoclonal 8.1 anti-BNP humano / proBNP humano (Scios, Sunnyvale, CA; nº de registro de la A.T.C.C. HB-12056) en la cantidad de 50 µl en el mismo recipiente de reacción. El recipiente de reacción se agitó después vorticialmente para mezclar la muestra y las micropartículas magnéticas. Cada mezcla de reacción se incubó durante 18 minutos a 37°C.

Durante esta incubación, cualquier proBNP humano de las muestras fue capturado por los anticuerpos monoclonales 8.1 con el que estaban recubiertas las micropartículas magnéticas.

Una vez completada la incubación de 18 minutos, las micropartículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 8.1 y los complejos del anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP se capturaron magnéticamente y se inmovilizaron en un agregado en el lateral del recipiente de reacción. Las micropartículas magnéticas inmovilizadas y el agregado del complejo del anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP se lavaron después aspirando alternativamente el líquido del recipiente, y añadiendo después tampón de lavado del kit de ensayo (tampón de lavado ARCHITECT®, disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) al recipiente de reacción (1 ml de tampón de lavado, se repitió 4 veces). Este proceso eliminó cualquier proBNP humano no unido de la mezcla de reacción. La micropartícula capturada magnéticamente, el proBNP humano de los complejos de anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP formado durante la incubación de 18 minutos permaneció en el recipiente de reacción. Entonces se liberó el agregado de micropartícula magnética del complejo de anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP humano.

Durante una segunda incubación de 4 minutos, se dispensó anticuerpo monoclonal anti-NT-proBNP humano / anti-proBNP humano 15C4 marcado con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park) (HyTest, Turku, Finlandia; nº de catálogo 4TN1) en la cantidad de 50 µl en recipientes de reacción individuales que sólo contenían las micropartículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 8.1 y los complejos de anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP. Esta mezcla de reacción se agitó después vorticialmente para dispersar el agregado de micropartículas.

Los complejos de micropartículas magnéticas y anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP se incubaron con los anticuerpos monoclonales 15C4 anti-proBNP humano marcados con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, Código 88333) en tampón durante 4 minutos a 37°C. Durante esta incubación, los anticuerpos monoclonales 15C4 anti-proBNP humano marcados con acridinio se unieron a los complejos de micropartículas magnéticas / anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP.

Una vez completada la incubación de 4 minutos, las micropartículas magnéticas, los complejos de anticuerpo monoclonal 8.1 / proBNP humano / anticuerpo monoclonal 15C4 marcado se capturaron de nuevo magnéticamente en un agregado. El agregado recapturado se lavó después repetidamente con tampón (1 ml), se repitió 4 veces. Entonces se liberaron los agregados de las micropartículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 8.1 capturadas magnéticamente, el proBNP humano y el complejo del anticuerpo monoclonal marcado 15C4 y anticuerpo monoclonal 8.1 / BNP.

Entonces se estimuló el marcador de acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park) para que emitiera luz. Esto se consiguió añadiendo un tampón de pH bajo (pH 1) que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,32%) (List 6E23-65, Abbott Laboratories,

Abbott Park, IL). Este fue dispensado en la cantidad de (100  $\mu$ l) en recipientes de reacción individuales que contenían los complejos de las micropartículas, y después se agitaron vorticialmente. Esta etapa liberó los anticuerpos monoclonales 15C4 anti-proBNP humano marcados con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL),

5 Entonces las micropartículas magnéticas se capturaron magnéticamente dejando los anticuerpos anti-proBNP liberados marcados con acridinio (anticuerpo monoclonal 15C4) en la disolución de la mezcla de reacción. Esto fue seguido por la adición (300  $\mu$ l) de un tampón de pH 13 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que "estimula" la producción de luz, unidades relativas de luz (RLU), por parte del acridinio liberado en la disolución. La cantidad de luz que fue generada se usó para determinar la cantidad de proBNP humano detectada en la muestra.

#### Detección de NT-proBNP humano

15 Cada dilución de la muestra fue dispensada en la cantidad de 100  $\mu$ l en los recipientes de reacción individuales. Al mismo tiempo se dispensaron micropartículas magnéticas recubiertas con EDAC al 0,10% (50  $\mu$ l) (Polymer Laboratories Ltd, ahora parte de Varian, Inc., Shropshire, Reino Unido) recubiertas con anticuerpo monoclonal 15F11 anti-NT-pro-BNP humano / anti-proBNP humano (HyTest, Turku, Finlandia; n° de catálogo 4TN1) en la cantidad de 50  $\mu$ l en el mismo recipiente de reacción. El recipiente de reacción se agitó después vorticialmente para mezclar la muestra y las micropartículas magnéticas. Cada mezcla de reacción se incubó durante 18 minutos a 20 37°C.

Durante esta incubación, cualquier NT-proBNP humano de las muestras fue capturado por los anticuerpos monoclonales 15F11 con el que estaban recubiertas las micropartículas magnéticas.

25 Una vez completada la incubación de 18 minutos, las micropartículas magnéticas recubiertas con 15F11 y los complejos del anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proBNP se capturaron magnéticamente y se inmovilizaron en un agregado en el lateral del recipiente de reacción. Las micropartículas magnéticas inmovilizadas y el agregado del complejo del anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proBNP se lavaron después aspirando alternativamente el líquido del recipiente, y añadiendo después tampón de lavado del kit de ensayo (tampón de lavado ARCHITECT®, disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) al recipiente de reacción (1 ml de tampón de lavado, se repitió 4 veces). Este proceso eliminó cualquier NT-proBNP humano no unido de la mezcla de reacción. Las micropartículas capturadas magnéticamente recubiertas con el NT-proBNP humano de los complejos de anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proBNP formado durante la incubación de 18 minutos permanecieron en el recipiente de reacción. Entonces se liberó del imán el agregado de micropartícula magnética del complejo de anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proBNP humano.

40 Durante la segunda incubación de 4 minutos, se dispensó anticuerpo monoclonal anti-NT-proBNP humano / anti-proBNP humano 15C4 marcado con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park) (HyTest, Turku, Finlandia; n° de catálogo 4TN1) en la cantidad de 50  $\mu$ l en recipientes de reacción individuales que sólo contenían las micropartículas magnéticas recubiertas con el 15F11 y los complejos de anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proBNP. Esta mezcla de reacción se agitó después vorticialmente para dispersar el agregado de micropartículas.

45 Una vez completada la incubación de 4 minutos, los complejos de las micropartículas magnéticas de anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proB-NP / anticuerpo monoclonal 15C4 marcado se capturaron de nuevo magnéticamente en un agregado. El agregado recapturado se lavó después repetidamente con tampón (1 ml), se repitió 4 veces. Entonces se liberaron del imán las micropartículas magnéticas capturadas magnéticamente, el anticuerpo monoclonal 15C4 marcado anti-NT-proBNP humano / anti-proBNP humano y el complejo del anticuerpo monoclonal 15F11 / NT-proBNP humano.

50 Entonces se estimuló el marcador de acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park) para que emitiera luz. Esto se consiguió añadiendo un tampón de pH bajo (pH 1) que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,32%) (List 6E23-65, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Este fue dispensado en la cantidad de (100  $\mu$ l) en recipientes de reacción individuales que contenían los complejos de las micropartículas, y después se agitaron vorticialmente. Esta etapa liberó los anticuerpos monoclonales 15C4 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) anti-NT-proBNP humano marcados con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que habían sido unidos al NT-proBNP humano capturado por las micropartículas.

60 Entonces las micropartículas magnéticas se capturaron magnéticamente dejando los anticuerpos NT-proBNP liberados marcados con acridinio (anticuerpo monoclonal 15C4) en la disolución de la mezcla de reacción. Esto fue seguido por la adición (300  $\mu$ l) de un tampón de pH 13 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que "estimula" la producción de luz, unidades relativas de luz (RLU), por parte del acridinio liberado en la disolución. La cantidad de luz que fue generada se usó para determinar la cantidad de NT-proBNP humano detectada en la muestra.

Los resultados se muestran a continuación, en la Tabla 1 y en la Figura 1A, en la Figura 1B y en la Figura 1C.

65

Tabla 1

<b>Anticuerpo monoclonal de captura</b>		<b>15F11</b>	<b>8.1</b>	<b>8.1</b>
<b>Anticuerpo monoclonal marcado</b>		<b>15C4</b>	<b>15C4</b>	<b>201.3</b>
<b>Muestra</b>	<b>pM</b>	<b>Rlus media</b>	<b>Rlus media</b>	<b>Rlus media</b>
<b>BNP</b>	<b>0</b>	1195	745	212
	<b>43,8</b>	1038	567	11033
	<b>86,6</b>	1082	713	29955
	<b>288,7</b>	1127	732	257748
	<b>577,4</b>	1145	701	1029195
<b>proBNP</b>	<b>0</b>	1135	659	283
	<b>43,8</b>	1302	5478	276
	<b>86,6</b>	1488	12015	262
	<b>288,7</b>	2214	42997	255
	<b>577,4</b>	3591	116479	276
<b>NT-proBNP</b>	<b>0</b>	1135	659	283
	<b>43,8</b>	22439	643	251
	<b>86,6</b>	62653	606	269
	<b>288,7</b>	316876	637	264
	<b>577,4</b>	657865	687	265

Tabla 2

<b>Reactivos del kit</b>		<b>Detección del analito</b>		
<b>Anticuerpo monoclonal de captura</b>	<b>Anticuerpo monoclonal marcado</b>	<b>BNP humano</b>	<b>proBNP Humano</b>	<b>NT-ProBNP humano</b>
15F11	15C4	-	-	+
8.1	15C4	-	+	-
8.1	201.3	+	-	-

5 **Análisis de los resultados**

Se usó un inmunoensayo en sándwich en dos etapas para cuantificar el NT-proBNP humano, el proBNP y el BNP humano. Los tres analitos se detectaron únicamente mediante el uso de dos kits de inmunoensayo. Según se usa en este documento, lo que se entiende por "kit de inmunoensayo" es un kit formado por un reactivo de captura de analito (a saber, micropartículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para el analito previsto) y un reactivo de detección (a saber, un anticuerpo monoclonal específico para el analito previsto, marcado con acridinio). A continuación se muestra una representación de los kits de inmunoensayo típicos, en la Tabla 3.

Tabla 3

	<b>Kit A</b>	<b>Kit B</b>
<b>Reactivo de detección</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Reactivo de captura</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Analito</b>	<b>A</b>	<b>B</b>

Mediante el uso de un reactivo de captura de un kit de inmunoensayo (por ejemplo, del Kit A) y del reactivo de detección de otro kit de inmunoensayo (por ejemplo, del Kit B), puede detectarse un tercer analito que comparte los epítomos A y B (AB). Esta representación se muestra a continuación en la Tabla 4 (véanse las Figuras 2A y 2B).

Tabla 4

<b>Reactivos del kit</b>				
<b>Detección</b>	<b>Captura</b>	<b>Analitos detectados</b>		
<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	-	-
<b>A</b>	<b>B</b>	-	<b>AB</b>	-
<b>B</b>	<b>B</b>	-	-	<b>B</b>

5 La presente desvelación utiliza únicamente partículas magnéticas de dos tipos, cada uno recubierto con diferentes anticuerpos monoclonales de captura, y únicamente dos anticuerpos monoclonales marcados diferentes, para detectar específicamente tres analitos, el BNP humano, el proBNP humano y el NT-proBNP humano.

10 El BNP humano se detectó mediante la creación de un "sándwich" usando anticuerpos monoclonales específicos para dos epítomos individuales del BNP encontrados en el BNP humano.

El NT-proBNP humano se detectó mediante la creación de un "sándwich" usando anticuerpos monoclonales específicos para dos epítomos individuales del NT-proBNP humano encontrados en el NT-proBNP humano.

15 El proBNP humano se detectó usando dos anticuerpos monoclonales, uno específico para un epítomo del BNP humano y el otro anticuerpo monoclonal específico para un epítomo del NT-proBNP humano. El proBNP humano contiene epítomos que se encuentran en el BNP humano y en el NT-proBNP humano. Un anticuerpo monoclonal de captura del BNP formó un sándwich con un anticuerpo monoclonal de detección del proBNP humano marcado, permitiendo la detección del proBNP humano.

20 El uso del anticuerpo monoclonal de captura de un analito con el anticuerpo de detección marcado de un segundo analito, es la base para la detección de los tres analitos (BNP humano, proBNP humano y NT-proBNP humano) usando únicamente dos kits.

25 El experto en la técnica apreciaría fácilmente que la presente desvelación está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionadas, así como aquellos inherentes al presente documento. Los complejos moleculares y los métodos, tratamientos, procedimientos, moléculas, compuestos específicos descritos en este documento son actualmente representativos de las formas de realización preferidas, son ejemplares y no pretenden ser limitaciones del ámbito de la desvelación.

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

35 La divulgación descrita ilustrativamente en este documento puede llevarse a la práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no estén específicamente desvelados en este documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso, en este documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" pueden ser sustituidos por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y las expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no existe la intención de que en el uso de dichos términos y expresiones se excluya cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o de porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones en el ámbito de la desvelación reivindicada. Por lo tanto, debería entenderse que aunque la presente desvelación se ha desvelado específicamente mediante las formas de realización preferidas y las características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos desvelados en este documento, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del

40

45 ámbito de esta desvelación, según se define en las reivindicaciones anexas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Konrath, John  
Moore, Jeff

<120> ENSAYOS PARA EL NT-PRO-PÉPTIDO NATRIURÉTICO DE TIPO B HUMANO, EL PRO-PÉPTIDO NATRIURÉTICO DE TIPO B HUMANO Y EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO DE TIPO B HUMANO

55 <130> Abbott Laboratories

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 134

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

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

```

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



ES 2 436 867 T3

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp  
1                   5                   10                   15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
20                   25                   30

## REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano"), de pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") y de péptido natriurético cerebral humano ("hBNP") en una muestra de prueba que se está ensayando o que se sospecha que contiene el NT-proBNP humano, el proBNP humano y el hBNP, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra de prueba con (i) un primer anticuerpo de captura que se une al NT-proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un primer anticuerpo inmovilizado y formar una primera mezcla que comprende un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano; (ii) un segundo anticuerpo de captura que se une al proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un segundo anticuerpo inmovilizado y formar una segunda mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano; y (iii) el segundo anticuerpo de captura, que además de unirse al proBNP humano también se une al hBNP y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un tercer anticuerpo inmovilizado y formar una tercera mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP humano, en el que dicho primer anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 15F11 y el segundo anticuerpo de captura comprende el anticuerpo 8.1;
- (b) poner en contacto dicha primera mezcla que comprende el complejo del primer anticuerpo de captura-NTproBNP humano con un primer anticuerpo de detección que se une al NT-proBNP humano y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una tercera mezcla que comprende un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primer anticuerpo de detección, en el que el primer anticuerpo de detección es el anticuerpo 15C4;
- (c) poner en contacto dicha según la mezcla que comprende el complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano con el primer anticuerpo de detección que, además de unirse al NT-proBNP humano, también se une al proBNP humano, y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una quinta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primer anticuerpo de detección, en el que el primer anticuerpo de detección es el anticuerpo 15C4;
- (d) poner en contacto la tercera mezcla que comprende el complejo del segundo anticuerpo de captura- hBNP humano con un segundo anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una sexta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección, en el que el segundo anticuerpo de detección es el anticuerpo 201.3; y
- (e) determinar la cantidad de (i) el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primer anticuerpo de detección formado en la etapa (b) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de NT-proBNP humano contenido en la muestra de prueba; (ii) el complejo segundo de anticuerpo de captura-proBNP humano-primer anticuerpo de detección formado en la etapa (c) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de proBNP humano contenido en la muestra de prueba; y (iii) el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección formado en la etapa (d) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de hBNP contenido en la muestra de prueba.
2. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que la fase sólida se elige de entre el grupo que consiste en una partícula magnética, una microesfera, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula estructural, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.
3. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el marcador detectable del primer anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa.
4. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el marcador detectable del segundo anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa.
5. Un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano"), de pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") y de péptido natriurético cerebral humano ("hBNP") en una muestra de prueba que se está ensayando o que se sospecha que contiene el NT-proBNP humano, el proBNP humano y el hBNP, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra de prueba con (i) un primer anticuerpo de detección que se une al NT-proBNP humano y que ha sido con un marcador detectable para formar una primera mezcla que comprende un complejo de NT-proBNP-primer anticuerpo de detección; (ii) el primer anticuerpo de detección que, además de unirse al NT-proBNP humano, también se une al proBNP humano y que ha sido conjugado con un marcador detectable para formar una segunda mezcla que comprende un complejo de proBNP humano-primer detección; y (iii) un segundo anticuerpo de detección que se une al hBNP y que ha sido conjugado con un marcador detectable para

formar adicionalmente en la tercera mezcla que comprende un complejo de hBNP-segundo anticuerpo de detección, en los que el primer anticuerpo de detección es el anticuerpo 15C4 y el segundo anticuerpo de detección es el anticuerpo 201.3;

5 (b) poner en contacto dicha primera mezcla que comprende el complejo NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección con un primer anticuerpo de captura que se une al NT-proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un primer anticuerpo inmovilizado para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección, en el primer anticuerpo de captura es 15F11;

10 (c) poner en contacto dicha segunda mezcla que comprende el complejo proBNP humano-primero anticuerpo de detección con un segundo anticuerpo de captura que se une al proBNP humano y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un segundo anticuerpo inmovilizado para formar una quinta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-proBNP humano-primero anticuerpo de detección, en el que el segundo anticuerpo de captura es 8.1;

15 (d) poner en contacto la tercera mezcla que comprende el complejo hBNP-segundo anticuerpo de detección con el segundo anticuerpo de captura que, además de unirse al proBNP humano también se une al hBNP, y que ha sido inmovilizado sobre una fase sólida para producir un segundo anticuerpo inmovilizado para formar una sexta mezcla que comprende un complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección, en el que el segundo anticuerpo de captura es 8.1; y

20 (e) determinar la cantidad de (i) el complejo del primer anticuerpo de captura-NT-proBNP humano-primero anticuerpo de detección formado en la etapa (b) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de NT-proBNP humano contenido en la muestra de prueba; (ii) el complejo del segundo anticuerpo de captura- proBNP humano-primero anticuerpo de detección formado en la etapa (c) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de proBNP humano contenido en la muestra de prueba; y (iii) el complejo del segundo anticuerpo de captura-hBNP-segundo anticuerpo de detección formado en la etapa (d) mediante la detección del marcador detectable como una medida de la cantidad de hBNP  
25 contenido en la muestra de prueba.

6. El inmunoensayo de la reivindicación 5, en el que la fase sólida se elige de entre el grupo que consiste en una partícula magnética, una microesfera, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula estructural, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.  
30

7. El inmunoensayo de la reivindicación 5, en el que el marcador detectable del primer anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa.  
35

8. El inmunoensayo de la reivindicación 5, en el que el marcador detectable del segundo anticuerpo de detección se elige de entre el grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico y un inmunomarcador de reacción en cadena de la polimerasa.  
40

9. Reactivos inmunodiagnósticos que comprenden:

45 (a) un primer anticuerpo de captura específico para el NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano");

(b) un segundo anticuerpo de captura que es específico para cada uno del pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") y del péptido natriurético cerebral humano ("hBNP");

(c) un primer anticuerpo de detección que es específico para cada uno del NT-proBNP humano y del proBNP humano; y

50 (d) un segundo anticuerpo de detección que es específico para el hBNP.

10. Los reactivos inmunodiagnósticos de la reivindicación 9, en los que el primer anticuerpo de captura es el anticuerpo 15F11.

55 11. Los reactivos inmunodiagnósticos de la reivindicación 9, en los que el segundo anticuerpo de captura es el anticuerpo 8.1.

60 12. Los reactivos inmunodiagnósticos de la reivindicación 9, en los que el primer anticuerpo de detección es el anticuerpo 15C4.

13. Los reactivos inmunodiagnósticos de la reivindicación 9, en los que el segundo anticuerpo de detección es el anticuerpo 201.3.

65 14. Un kit para detectar la cantidad de NT-pro-péptido natriurético de tipo B humano ("NT-proBNP humano"), de pro-péptido natriurético de tipo B humano ("proBNP humano") y de péptido natriurético cerebral humano ("hBNP") en

una muestra de prueba, comprendiendo dicho kit:

- (a) instrucciones para realizar el ensayo de la muestra de prueba; y
- (b) reactivos inmunodiagnósticos que comprenden:

- 5 (i) un primer anticuerpo de captura específico para el NT-proBNP humano;
- (ii) un segundo anticuerpo de captura que es específico para cada uno del proBNP humano y del hBNP;
- (iii) un primer anticuerpo de detección que es específico para cada uno del NT-proBNP humano y del proBNP humano; y
- 10 (iv) un segundo anticuerpo de detección que es específico para el hBNP.

15. El kit de la reivindicación 14, en el que  
el primer anticuerpo de captura es el anticuerpo 15F11;  
el segundo anticuerpo de captura es el anticuerpo 8.1;
- 15 el primer anticuerpo de detección es el anticuerpo 15C4;  
o  
el segundo anticuerpo de detección es el anticuerpo 201.3.

FIGURA 1

FIGURA 1A.

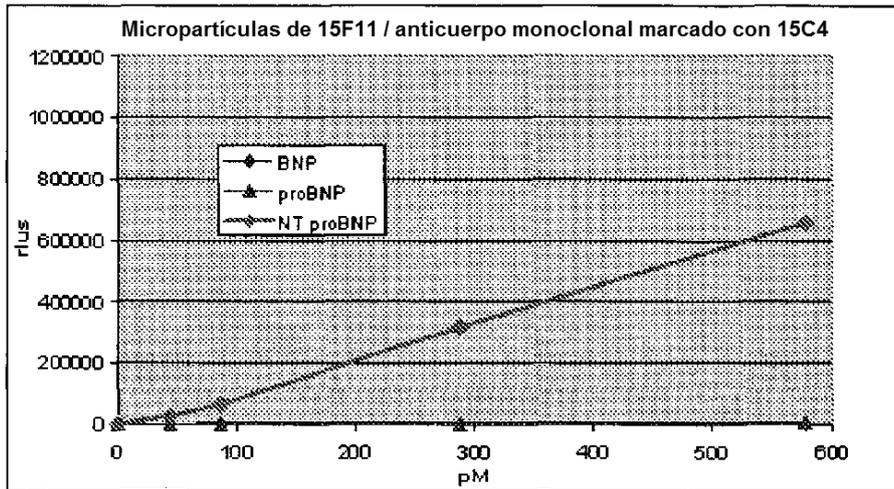


FIGURA 1B

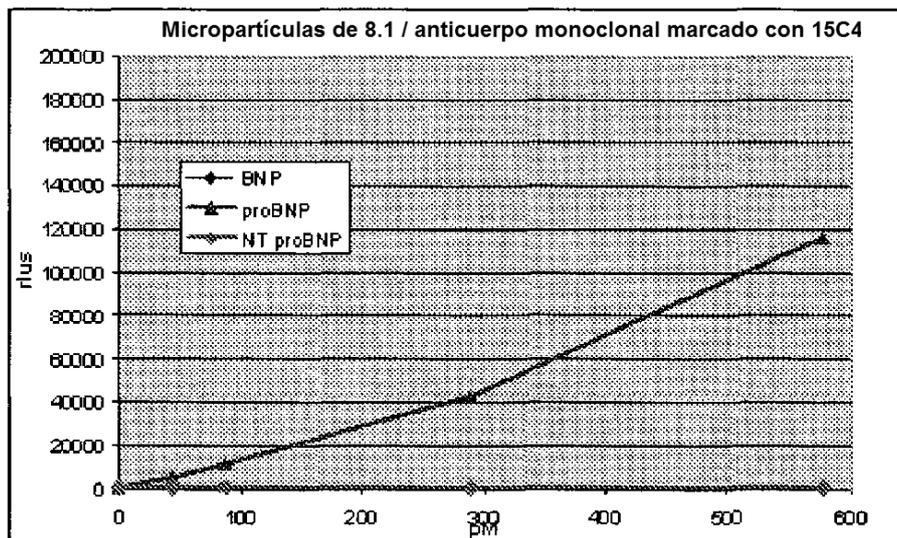


FIGURA 1C

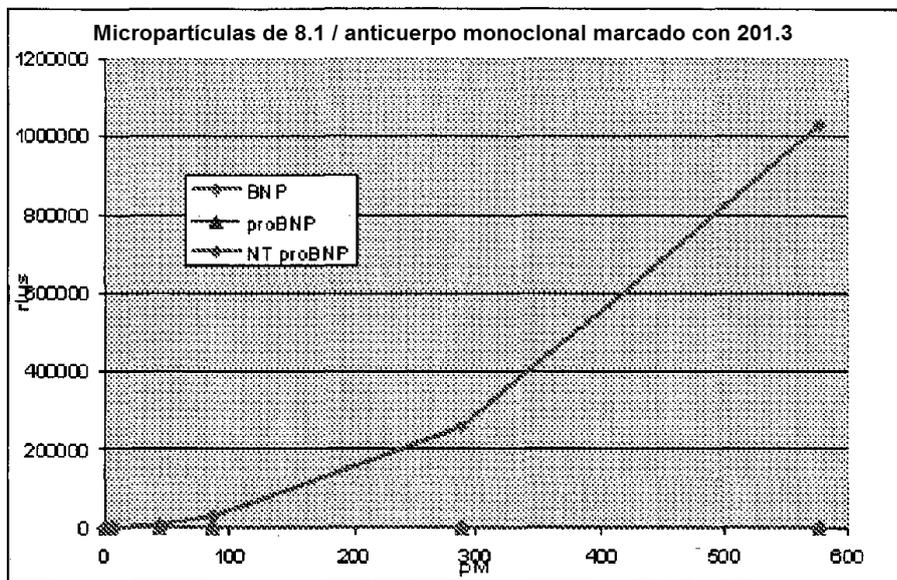


FIGURA 2

Figura 2A

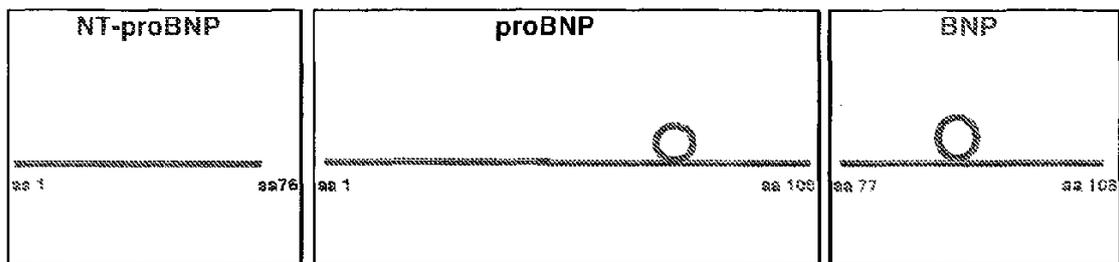


Figura 2B

