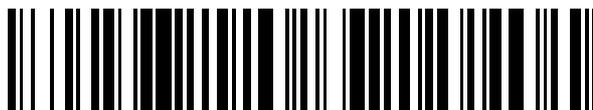


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 762**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C07K 14/58 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.1997 E 10013178 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2292662**

54 Título: **Ensayo y reactivos para cuantificar BNPh**

30 Prioridad:

04.03.1996 US 610172 P

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

26.05.2014

73 Titular/es:

**SCIOS INC. (100.0%)
1125 Trenton Harbourton Road
Titusville, NJ 08560, US**

72 Inventor/es:

**MISCHAK, RONALD P.;
LIM, GARRET A. y
SCARDINA, JAN MARIAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 462 762 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo y reactivos para cuantificar BNPh

Antecedentes de la invención**I. Campo de la Invención**

Esta invención está relacionada con el campo de los inmunoensayos, más particularmente, con reactivos y métodos útiles para la cuantificación rápida y sensible de la hormona peptídica BNPh en un fluido biológico, como el plasma o el suero.

II. Descripción de los antecedentes en este campo

El BNP es una hormona peptídica derivada cardiaca que circula en la sangre y ejerce potentes acciones cardiovasculares y renales. El BNP es similar estructuralmente a otros dos péptidos cardiacos, el péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético tipo C (CNP). El BNP porcino fue aislado de cerebro porcino (Sudoh, *et al.*, *Nature* 332:78-81, 1988) y, de ahí, le fue dado el nombre de "péptido natriurético cerebral". En el hombre el ventrículo cardiaco es el lugar principal de síntesis del BNP. La secuencia del BNP humano (BNPh) fue determinada originariamente por medio del aislamiento y caracterización de clones de ADN procedentes de librerías genómicas humanas (Patente americana N° 5.114.923). El BNPh es sintetizado *in vivo* como un precursor de 108 aminoácidos que es clivado enzimáticamente para proporcionar el péptido BNPh maduro. El BNPh maduro consiste en un péptido de 32 aminoácidos conteniendo una estructura de anillo de 17 aminoácidos formada por dos enlaces disulfuro (ver Fig. 1).

Ha sido reportada una elevada expresión de ARNm del BNPh ventricular en pacientes con fallo cardiaco congestivo cuando es comparada con los controles normales. Consecuentes con el aumento en masa ventricular y expresión de ARNm del BNP, los niveles de BNPh son elevados en pacientes con fallo cardiaco congestivo y parece que tienen correlación con la severidad de la enfermedad. Se cree también que el BNPh plasmático proporciona un valioso marcador predictivo de la enfermedad cardiaca. Ha sido reportado un elevado BNPh plasmático en la enfermedad cardiaca, después de infarto de miocardio agudo y durante disfunción ventricular asintomática o subclínica (Mukoyama *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 87:1402-1412, 1991) (Motwani *et al.*, *Lancet*, 341: 1109-1113, 1993) (Yoshibayashi *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 327:434, 1992). Informes procedentes de dos importantes estudios terapéuticos, el estudio SAVE (*New Eng. J. Med.*, 327:669-677, 1992) y el estudio SOLVD (*New Eng. J. Med.*, 327:685-691, 1992) sugirieron que el diagnóstico y tratamiento apropiado de pacientes con disfunción ventricular izquierda asintomática podría reducir de forma significativa la incidencia de sucesos cardiovasculares fatales o no fatales y las hospitalizaciones relacionadas con los mismos.

Para su utilización en un escenario de laboratorio clínico, sería deseable en alto grado el proporcionar un ensayo diagnóstico para BNPh que fuera lo suficientemente sensible como para medir títulos clínicamente relevantes de BNPh, lo suficientemente sencillo como para que fuera automatizado, que requiriera una mínima cantidad de tiempo para llevarse a cabo y que, preferiblemente, no requiriera la utilización de reactivos con un tiempo limitado de durabilidad. Los niveles normales de BNPh en plasma son bastante bajos, del orden de 1 a 20 pg/mL. Usualmente son utilizados radioinmunoensayos para medir títulos en este rango, aunque la utilización de reactivos radioactivos requiere de un manejo especial, añade fases al ensayo e implica la utilización de material que posee un tiempo limitado de durabilidad. Se encuentra disponible en el mercado un radioinmunoensayo para la medición del BNPh. Sin embargo, además de requerir la utilización de reactivos radioactivos, es complejo e incómodo, requiriendo una fase de extracción, precipitación y varias fases de centrifugado, y lleva varios días para su realización. La Solicitud de Patente Europea N° 0 542 255 describe un radioinmunoensayo para BNPh.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona reactivos y métodos para la cuantificación rápida y directa de los niveles de BNPh en fluidos biológicos. Los reactivos y métodos aquí proporcionados permiten la detección de títulos de BNPh a niveles clínicamente relevantes sin la utilización de marcaje radioactivo (aunque puede ser utilizado el marcaje radioactivo, si así se desea). Además, proporcionan la cuantificación directa de BNPh en el plasma sin que sean necesarias incómodas fases de extracción. Los reactivos y métodos aquí proporcionados se prestan fácilmente a los sistemas automatizados utilizados para realizar pruebas sanguíneas a gran escala en laboratorios clínicos comerciales.

En una realización de la invención son proporcionados anticuerpos monoespecíficos de epítopes peptídicos seleccionados dentro de la molécula de BNPh. Preferiblemente, estos anticuerpos monoespecíficos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoespecíficos de la invención son seleccionados de entre el grupo consistente en:

- (a) un anticuerpo que es monoespecífico de un epítipo peptídico que consiste en los aminoácidos 5-13 de BNPh;
- (b) un anticuerpo, que es monoespecífico de un epítipo peptídico que consiste en los aminoácidos 1-10 de

BNPh; y

(c) un anticuerpo que es monoespecífico de un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 15-25 de BNPh o fragmentos del mismo que retienen la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo.

5 Un anticuerpo preferido de la invención es un anticuerpo monoclonal que reconoce y se une al epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 5-13 de BNPh.

10 En otra realización de la invención es proporcionado un método para cuantificar la cantidad de BNPh en un fluido biológico utilizando los reactivos de la invención en un inmunoensayo de tipo sándwich. El inmunoensayo puede emplear cualquiera de las numerosas técnicas de marcaje para marcar y cuantificar complejos inmunes, siendo preferido el marcaje enzimático. Este método de la invención comprende las etapas de:

15 (a) puesta en contacto de una muestra del fluido biológico con un primer anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en:

(i) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 5-13 de BNPh;

(ii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-10 de BNPh;

20 (iii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 15-25 de BNPh; y

fragmentos de (i)-(iii) que retienen dicha reactividad monoespecífica.

y un segundo anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en:

25 (i) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 5-13 de BNPh;

(ii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-10 de BNPh;

30 (iii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 15-25 de BNPh;

(iv) un anticuerpo policlonal de elevada afinidad a BNPh; y fragmentos de (i)-(iv) que retienen dicha reactividad monoespecífica, en condiciones que permitan la formación de un complejo de primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo;

35 (b) unir un marcador cuantificable a dicho segundo anticuerpo antes de, simultáneamente con o después de la formación del complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo; y

(c) la determinación de la cantidad de BNPh en la muestra por medio de la cuantificación del marcador en el complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo.

40 En otras realizaciones de la invención son proporcionados métodos para cuantificar la cantidad de BNPh en un fluido biológico utilizando los reactivos de la invención en inmunoensayos de tipo competitivo. Uno de estos ensayos comprende las fases de:

45 (a) puesta en contacto de una muestra del fluido biológico con:

(i) un anticuerpo que es monoespecífico de un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 5-13 del BNPh o un fragmento del mismo que retiene la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo; y

(ii) BNPh, o un fragmento del mismo, comprendiendo los aminoácidos 5-13 del BNPh,

50 teniendo unido al mismo un marcador cuantificable,

bajo condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-BNPh; y

(b) determinación de la cantidad de BNPh en la muestra por medio de la cuantificación del marcador en el complejo anticuerpo-BNPh.

55 Otra realización del ensayo de la invención en un formato de tipo competitivo comprende las fases de:

(a) puesta en contacto de una muestra del fluido biológico con:

60 (i) un anticuerpo que es monoespecífico de un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-10 del BNPh o un fragmento del mismo que retiene la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo; y

(ii) BNPh, o un fragmento del mismo, comprendiendo los aminoácidos 1-10 del BNPh;

teniendo unido al mismo un marcador cuantificable,

bajo condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-BNPh; y

65 (b) determinación de la cantidad de BNPh en la muestra por medio de la cuantificación del marcador en el complejo anticuerpo-BNPh.

Otra realización del ensayo de la invención en un formato de tipo competitivo comprende las fases de:

(a) puesta en contacto de una muestra del fluido biológico con:

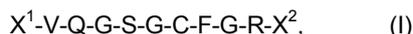
- 5 (i) un anticuerpo que es monoespecífico de un epítoto peptídico que consiste en los aminoácidos 15-25 del BNP_h o un fragmento del mismo que retiene la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo; y
 (ii) BNP_h, o un fragmento del mismo, comprendiendo los aminoácidos 15-25 del BNP_h; teniendo unido al mismo un marcador cuantificable,
 10 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-BNP_h; y

(b) determinación de la cantidad de BNP_h en la muestra por medio de la cuantificación del marcador en el complejo anticuerpo-BNP_h.

15 En los ensayos tipo sándwich y en los ensayos de tipo competitivo de la invención el complejo primer anticuerpo-BNP_h-segundo anticuerpo (en el caso de un ensayo tipo sándwich) o el complejo anticuerpo-BNP_h (en el caso de un ensayo de tipo competitivo) usualmente serán separados del resto de muestra de fluido biológico con anterioridad a la cuantificación del marcador en el complejo. Sin embargo, existen técnicas conocidas de marcaje que permiten la medición directa del complejo marcado en la muestra, *i.e.* sin separar el complejo de la muestra, y se considera que tales métodos se encuentran dentro del ámbito de la invención. Solo como ejemplo de tales métodos, se puede
 20 mencionar el ensayo de escintilación por proximidad (Udenfriend, S. *et al.*, Anal. Biochem., 161:494-500, 1987) y el ensayo descrito en Mathis, G., Clin. Chem., 41:1391-1397, 1995.

Pueden ser utilizados fragmentos de BNP_h como reactivos en un ensayo de tipo competitivo de la invención.

25 Un tal fragmento de BNP_h posee la fórmula



30 en donde X¹ es seleccionado de entre el grupo consistente en hidrógeno,

M-,
 K-M-,
 P-K-M- o
 S-P-K-M-

35 y X² es seleccionado de entre el grupo consistente en

hidroxilo,
 -K,
 -K-M,
 -K-M-D; y
 40 -K-M-D-R,

Otro tal fragmento de BNP_h posee la fórmula



45 en donde X³ es seleccionado de entre el grupo consistente en hidroxilo,

-F y
 -F-G,

50 En otra realización, el fragmento de BNP_h de la invención posee la fórmula



55 en donde X⁴ es seleccionado de entre el grupo consistente en hidrógeno,

K-,
 R-K- y
 G-R-K-

60 y X⁵ es seleccionado de entre el grupo consistente en

hidroxilo,
 -C,
 -C-K,
 -C-K-V,
 65 -C-K-V-L,
 -C-K-V-L-R,

-C-K-V-L-R-R y
-C-K-V-L-R-R-H.

Descripción de los dibujos

- 5 La Fig. 1 es una representación de la secuencia aminoacídica de la forma madura (32 aminoácidos) del BNPh. Los aminoácidos son representados por medio del código de letra única estándar y la línea negra representa un enlace disulfuro entre los dos residuos de cisteína.
- 10 La Fig. 2 representa los resultados de los experimentos realizados para determinar la habilidad del antisuero policlonal de conejo unido al BNPh para unirse a varios fragmentos de BNPh.
- 15 La Fig. 3 representa los resultados de los estudios de mapeo epitópico de tres anticuerpos monoclonales designados como MAb 201.3, MAb 106.3 y MAb 8.1.
- 20 La Fig. 4 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich utilizando el MAb 106.3 como el anticuerpo de captura, y un anticuerpo policlonal n° 4024 como el segundo anticuerpo.
- 25 La Fig. 5 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich utilizando el MAb 201.3 como el anticuerpo de captura, y el anticuerpo policlonal n° 4360 como el segundo anticuerpo.
- 30 La Fig. 6 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich utilizando el MAb 106.3 como el anticuerpo de captura, y un anticuerpo monoespecífico contra el epítotope 15-25 como el segundo anticuerpo.
- 35 La Fig. 7 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich utilizando el MAb 201.3 como el anticuerpo de captura, y un anticuerpo policlonal monoespecífico contra el epítotope 15-25 como el segundo anticuerpo.
- 40 La Fig. 8 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente de tipo sándwich utilizando el MAb 8.1 como el anticuerpo de captura, y el MAb 106.3 biotinilado como el segundo anticuerpo en un sándwich monoclonal:monoclonal.
- 45 La Fig. 9 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente de tipo sándwich utilizando el MAb 201.3 como un anticuerpo de captura, y el MAb 8.1 biotinilado como un segundo anticuerpo en un sándwich monoclonal:monoclonal.
- 50 La Fig. 10 es una curva estándar para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo competitivo utilizando el MAb 106.3 como el anticuerpo.
- 55 La Fig. 11 presenta los resultados obtenidos utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo competitivo para cuantificar los niveles de BNPh en el plasma de sujetos de control normales y sujetos con enfermedad coronaria congestiva.

Descripción detallada y realizaciones preferidas de la invención

I. Anticuerpos de la Invención

50 Esta invención proporciona reactivos altamente sensibles, los cuales permiten una cuantificación rápida, sencilla y segura de BNPh en títulos clínicamente relevantes en fluidos biológicos, como el plasma o el suero. En particular, hemos identificado tres epítotoes altamente inmunogénicos previamente no identificados dentro de la molécula de BNPh, y hemos producido anticuerpos monoespecíficos para estas regiones. Cuando nos referimos aquí a un anticuerpo como "monoespecífico" de un epítotope, se quiere decir que el anticuerpo es capaz de unirse a una secuencia de aminoácidos dentro del BNPh conteniendo los aminoácidos que consisten en el epítotope, pero es incapaz de unirse a una secuencia de aminoácidos dentro del BNPh que no contenga los aminoácidos en que consiste el epítotope. Los anticuerpos monoespecíficos de la invención son, preferiblemente, aunque no necesariamente, anticuerpos monoclonales.

60 Los tres epítotoes reconocidos por los anticuerpos monoespecíficos de la invención consisten en los aminoácidos 1-10, 5-13 y 15-25 del BNPh.

65 Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden ser producidos por células hibridoma preparadas conforme a procedimientos conocidos, por ejemplo, Kohler, G. y Milstein, C., *Nature*, 256:495, 1975. En general, los ratones son inmunizados con un conjugado inmunogénico de BNPh y un complemento adecuado, como la albúmina de suero bovino. Son administradas inyecciones de refuerzo periódicas hasta que son conseguidos títulos viables de anticuerpo. Células de bazo procedentes de ratones inmunizados son fusionadas entonces con células de mieloma

conforme a procedimientos conocidos (por ejemplo Galfre *et al.*, *Nature*, 266:550, 1977) con el fin de producir células hibridoma. Los sobrenadantes procedentes de los cultivos de células hibridoma son escrutados para determinar la reactividad al BNPh. Los hibridomas con resultado positivo son vueltos a clonar y a sus sobrenadantes se les somete a nuevo escrutinio para determinar la reactividad. Utilizando este procedimiento, conforme es descrito más abajo con detalle, obtuvimos la línea celular hibridoma 106.3, la cual secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el fragmento 5-13 de BNPh, la línea celular hibridoma 201.3, la cual secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el fragmento 1-10 de BNPh, y la línea celular hibridoma 8.1, la cual secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el fragmento 27-32 de BNPh.

Una vez que ha sido identificado un epítoto altamente inmunogénico, pueden ser producidos anticuerpos mono-específicos no monoclonales partiendo de antisuero policlonal. El suero policlonal es producido conforme a técnicas conocidas. Un animal adecuado, como un conejo, es inmunizado con un conjugado inmunogénico de BNPh y un complemento adecuado. Son administradas inyecciones de refuerzo periódicas hasta que son conseguidos títulos viables del anticuerpo. Son identificados epítotos deseables por medio del análisis del antisuero así obtenido para la inmunoreactividad contra distintos fragmentos peptídicos de BNPh. Utilizando este procedimiento, identificamos el fragmento peptídico de BNPh 15-25 como un epítoto altamente inmunogénico de BNPh. Los anticuerpos mono-específicos del epítoto identificado pueden ser obtenidos por medio de purificación por afinidad, o por medio de suero policlonal en una columna de afinidad, en la cual un fragmento peptídico incluyendo solo ese epítoto -y ninguno de los otros epítotos identificados en el mapeo epitópico- se encuentra unido a un soporte sólido. Utilizando este procedimiento general, conforme es descrito más abajo en detalle, produjimos anticuerpos mono-específicos no monoclonales que reconocen específicamente el fragmento 15-25 de BNPh.

Sin embargo, se reconocerá que los anticuerpos monoclonales de este epítoto pueden ser producidos también utilizando procedimientos conocidos.

Fragmentos funcionalmente activos de los anticuerpos mono-específicos de la invención pueden ser utilizados también en ensayos para el BNPh. Un fragmento funcional es uno que retiene la especificidad inmunológica del anticuerpo, aunque la avidéz y/o afinidad pueden no ser cuantitativamente idénticas. Incluidos dentro de los fragmentos funcionalmente activos se encuentran fragmentos inmunoglobulínicos tales como el Fab, F(ab')₂ y Fab'. Los fragmentos pueden ser producidos por medio de métodos conocidos tales como el clivaje enzimático de los anticuerpos mono-específicos (ver, por ejemplo, Mariani, M. *et al.*, *Mol. Immunol.*, 28:69-77, 1991; Ishikawa, E. *et al.*, *J. Immunoassay*, 4:209-327, 1983).

II. Fragmentos peptídicos de BNPh útiles en Inmunoensayos

Con el fin de llevar a cabo un inmunoensayo en un formato de tipo competitivo es necesario emplear un péptido marcado, el cual sea capaz de competir con el BNPh en la muestra de fluido biológico que es ensayada para unirse al anticuerpo utilizado en el ensayo. El péptido marcado puede ser el BNPh 1-32 marcado. Sin embargo, utilizando los anticuerpos mono-específicos de esta invención no es necesario utilizar el BNPh 1-32 intacto como el reactivo competidor. Más bien, pueden ser utilizados los nuevos fragmentos peptídicos de BNPh de las fórmulas I-III (anteriores). En las fórmulas I-III, los aminoácidos son representados por sus abreviaturas estándar de letra única. Una indicación de que X¹ o X⁴ es hidrógeno significa que representa el extremo amino terminal del fragmento peptídico. Una indicación de que X², X³ o X⁵ es hidroxilo significa que representa el extremo carboxilo terminal del fragmento peptídico.

En particular, los fragmentos peptídicos de la fórmula I -los cuales contienen los aminoácidos 5-13 de la secuencia de BNPh- pueden ser utilizados como reactivos para competir con el BNPh en la muestra de prueba para unirse a un anticuerpo de la invención que sea mono-específico para el epítoto que consiste en los aminoácidos 5-13. Los fragmentos peptídicos de la fórmula I, en los cuales X¹ es S-P-K-M-, pueden ser utilizados como reactivos en un ensayo de tipo competitivo, empleando un anticuerpo de la invención que sea mono-específico para el epítoto que consiste en los aminoácidos 1-10.

Los fragmentos peptídicos de la fórmula II -los cuales contienen los aminoácidos 1-10 de BNPh- pueden ser utilizados como reactivos para competir con el BNPh en la muestra de prueba, para unirse a un anticuerpo de la invención que sea mono-específico para el epítoto que consiste en los aminoácidos 1-10.

Los fragmentos peptídicos de la fórmula III -los cuales contienen los aminoácidos 15-25 del BNPh- pueden ser utilizados como reactivos para competir con el BNPh en la muestra de prueba, para unirse a un anticuerpo de la invención que sea mono-específico para el epítoto que consiste en los aminoácidos 15-25.

Adicionalmente se pueden emplear, con el mismo propósito, péptidos correspondientes a los péptidos de las fórmulas I-III, en los cuales todos los aminoácidos han sido substituidos por los correspondientes aminoácidos D (a partir de ahora referidos como "isómeros D-aminoácido") o se pueden emplear isómeros retro-inversos o isómeros retro-inversos parcialmente modificados de los péptidos de las fórmulas I-III. Los isómeros retro-inversos son isómeros en los cuales es revertida la dirección de la secuencia y es invertida la quiralidad de cada residuo de aminoácido. Los isómeros retro-inversos parcialmente modificados son isómeros en los cuales sólo algunos de los

enlaces peptídicos son revertidos y es invertida la quiralidad de los residuos de aminoácido en la porción revertida. Los isómeros retro-inversos y los isómeros retro-inversos parcialmente modificados son descritos por Chorev, M. y Goodman, M., TIBTECH, Vol. 13:438-444, 1995. Estos isómeros han demostrado poseer reactividad cruzada inmunológica con sus péptidos progenitores.

Los fragmentos peptídicos de la invención pueden ser preparados por medio de métodos conocidos por aquéllos expertos en este campo como, por ejemplo, la síntesis peptídica en fase sólida, utilizando el procedimiento de Merrifield *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:3449-3453, 1995). Los derivados retro-inversos pueden ser preparados por medio del procedimiento de Briand *et al.*, J. Biol. Chem., 270:20686-20691, 1995.

III. Inmunoensayos de la Invención

Los reactivos de la invención pueden ser utilizados para llevar a cabo inmunoensayos con el fin de cuantificar los niveles de BNPh en fluidos biológicos tales como el plasma, el suero y la sangre completa. Los ensayos pueden ser realizados bien en un formato de tipo sándwich o en un formato competitivo. Cuando se miden los niveles de BNPh en la sangre el fluido biológico preferido es el plasma o el suero, el cual puede ser preparado de sangre completa utilizando procedimientos conocidos.

En un ensayo de tipo sándwich son empleados dos anticuerpos diferentes para separar y cuantificar el BNPh en la muestra de fluido biológico. Los dos anticuerpos se unen al BNPh, formando de este modo un complejo inmune, o sándwich. Por lo general, uno de los anticuerpos es utilizado para capturar el BNPh en la muestra y es empleado un segundo anticuerpo para unir un marcador cuantificable al sándwich. Preferiblemente, los anticuerpos escogidos para llevar a cabo el ensayo de tipo sándwich son seleccionados de tal forma que el primer anticuerpo -el cual es puesto en contacto con la muestra que contiene el BNPh- no se une por completo o en parte al epítotope reconocido por el segundo anticuerpo, interfiriendo así de forma significativa con la habilidad del segundo anticuerpo para unirse al BNPh. Por lo tanto, si es escogido un formato de tipo sándwich, preferiblemente no se debería emplear un anticuerpo monoespecífico para el BNPh 5-13 en combinación con un anticuerpo monoespecífico para el BNPh 1-10, puesto que los epítotes reconocidos por estos anticuerpos se solapan. Sin embargo, hemos descubierto que puede ser realizado un excelente ensayo utilizando un anticuerpo monoespecífico como el primer anticuerpo puesto en contacto con la muestra conteniendo BNPh, y un anticuerpo policlonal con alta afinidad para el BNPh 1-32 como el segundo anticuerpo. En particular, hemos producido un ensayo de tipo sándwich que es sensible en el rango de los títulos de BNPh clínicamente relevantes utilizando un anticuerpo monoclonal -el cual reconoce el epítotope BNPh 5-13- como un anticuerpo de captura, y un anticuerpo policlonal de conejo para el BNPh como el segundo anticuerpo (ver Ejemplos 9 y 10).

La muestra de fluido puede ser puesta en contacto con el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo simultáneamente o de forma secuencial. En una realización preferida del ensayo tipo sándwich de la invención la muestra de fluido biológico conteniendo el BNPh-h es puesta en contacto primeramente con un primer anticuerpo, el cual es monoespecífico para un epítotope particular, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo anticuerpo-BNPh. Preferiblemente, el primer anticuerpo es unido a un soporte sólido con el fin de facilitar la separación final del complejo sándwich de la muestra de fluido. Los soportes sólidos que pueden ser utilizados son de sobra conocidos para aquéllos expertos en este campo y pueden ser, por ejemplo, materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o gránulos. El anticuerpo puede ser unido al soporte sólido por medio de adsorción o por enlace covalente, utilizando un agente de acoplamiento químico, siempre que el agente de acoplamiento utilizado no interfiera con la habilidad del anticuerpo para unirse al BNPh. Los materiales de soporte poliméricos pueden ser derivatizados para permitir la reactividad con distintos grupos funcionales en el anticuerpo. Los agentes de acoplamiento utilizados usualmente incluyen el anhídrido maléico, la N-hidroxisuccinimida y la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. En un ensayo de tipo sándwich el anticuerpo es empleado usualmente en cantidades con un substancial exceso molar de la cantidad máxima de BNPh que se espera encontrar en la muestra. Preferiblemente, son empleados desde alrededor de 0,01 nM a alrededor de 1,0 nM de anticuerpo por mL de plasma no diluido. En la práctica, se puede diluir la muestra de fluido biológico en un tampón fisiológico adecuado, con el fin de conseguir una proporción molar aceptable de anticuerpo/BNPh.

Después de que la muestra conteniendo el BNPh es puesta en contacto con el primer anticuerpo monoespecífico, la muestra es incubada para permitir la formación de un primer complejo anticuerpo-BNPh. Por lo general, la incubación es llevada a cabo en con pH fisiológico o cercano a él, por ejemplo de pH 6,0 a pH 8,0, a una temperatura de desde alrededor de 4°C a alrededor de 37°C. El tiempo de incubación es, al menos, de alrededor de 2 minutos, aunque la incubación puede ser de hasta 18 horas.

El primer complejo anticuerpo-BNPh es puesto en contacto con el segundo anticuerpo bajo condiciones que permiten la formación de un complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo. Usualmente esto significa la incubación bajo condiciones similares a aquéllas descritas más arriba para la formación del complejo primer anticuerpo-BNPh. Un marcador cuantificable es unido al segundo anticuerpo con anterioridad, simultáneamente o después de la formación del complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo. Puede ser empleado cualquiera de los marcadores conocidos utilizados convencionalmente en inmunoensayos. Estos pueden ser, por ejemplo, marcadores radioactivos, tales como el ¹²⁵I, marcadores enzimáticos tales como la peroxidasa de rábano picante o la

fosfatasa alcalina, marcadores quimioluminiscentes tales como los ésteres de acridinio, marcadores bioluminiscentes, marcadores fluorescentes, marcadores termométricos, inmuno marcadores de reacción en cadena de la polimerasa, u otros. Para una revisión de los marcadores más sensibles que pueden ser utilizados en los ensayos de la invención ver Kricka, L.J., *Clin. Chem.*, 40(3):347-357, 1994 y Kricka, L.J., *Clin. Biochem.*, 26:325-331, 1993. El marcador puede ser unido al anticuerpo directamente o por medio de un agente acoplador. Por ejemplo, en el caso de la peroxidasa de rábano picante, el segundo anticuerpo puede ser unido a biotina, utilizando técnicas conocidas. Después de la formación del complejo primer anticuerpo-BNPh- segundo anticuerpo, el complejo puede ser puesto en contacto con avidina-peroxidasa de rábano picante, la cual se encuentra estrechamente unida por la biotina al segundo anticuerpo. Un método alternativo de unión del marcador con el segundo anticuerpo implica la puesta en contacto del complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo con un anticuerpo que reconozca y se una a la región F_c del segundo anticuerpo y el cual posea el marcador unido al mismo. Otros métodos de unión del marcador al segundo anticuerpo serán fácilmente evidentes para aquéllos expertos en este campo.

En una realización preferida, el complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo es separado del resto de la muestra de fluido biológico con anterioridad a la cuantificación del marcador. Cuando el primer anticuerpo es unido al soporte sólido –como un pocillo o un gránulo– la separación es realizada simplemente al apartar el fluido del soporte sólido. Por ejemplo, el primer anticuerpo unido a un soporte sólido puede ser incubado con la muestra conteniendo el BNPh con el fin de formar un complejo de primer anticuerpo-BNPh y, a continuación, la muestra de fluido puede ser separada del soporte sólido con anterioridad a la puesta en contacto del complejo primer anticuerpo-BNPh con el segundo anticuerpo. Alternativamente, el primer anticuerpo unido a un soporte sólido puede ser puesto en contacto simultáneamente con la muestra conteniendo el BNPh y el segundo anticuerpo, con el fin de formar un complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo, seguido de la separación del fluido biológico del soporte sólido.

Después de la formación del complejo marcado primer anticuerpo-BNPh- segundo anticuerpo y de la separación del complejo del resto de muestra de fluido biológico, la cantidad de marcador en el complejo es cuantificada utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, en el caso de un marcador enzimático se hace reacción al complejo marcado con un sustrato para el marcador, proporcionando una reacción cuantificable como la de aparición de color. Donde el marcador enzimático es la peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, el complejo marcado es hecho reaccionar con tetrametilbenzidina (TMB), proporcionando una reacción que puede ser cuantificada midiendo la aparición de color. Donde el marcador es un marcador radioactivo, el marcador es cuantificado utilizando un contador de escintilación. Son de sobra conocidos numerosos métodos más para la cuantificación de distintos tipos de marcadores que pueden ser utilizados en los ensayos de la invención. Una vez que ha sido cuantificada la cantidad de marcador en el complejo es determinada la concentración de BNPh en la muestra de fluido biológico por medio de la utilización de una curva estándar, la cual ha sido generada utilizando diluciones en serie de BNPh de concentración conocida.

El ensayo de la invención puede ser también llevado a cabo en un formato competitivo. En este formato es utilizada una alícuota del BNPh marcado, o un fragmento adecuado del mismo, de concentración conocida para competir con el BNPh en el fluido biológico para unirse al anticuerpo monoespecífico de BNPh. En el ensayo competitivo el anticuerpo inmovilizado puede ser puesto en contacto simultánea o secuencialmente con la muestra de fluido biológico y el BNPh, o fragmento de BNPh, marcado. El BNPh, o fragmento de BNPh, marcado, la muestra de fluido y el anticuerpo son incubados bajo condiciones similares a aquéllas indicadas más arriba en la descripción del ensayo de tipo sándwich. De este modo son formadas dos especies de complejos de anticuerpo-BNPh, estando marcada una de ellas y la otra estando sin marcar. Es cuantificada la cantidad de marcador en el complejo anticuerpo-BNPh. La concentración de BNPh en la muestra de fluido biológico puede ser entonces determinada al comparar la cantidad de marcador en el complejo anticuerpo-BNPh con una curva estándar generada utilizando diluciones en serie de BNPh de concentración conocida. Preferiblemente, el complejo anticuerpo-BNPh es separado del resto de muestra de fluido biológico con anterioridad a la cuantificación del marcador en el complejo.

Los marcadores que pueden ser empleados en el formato competitivo incluyen aquéllos previamente indicados como útiles en un ensayo de tipo sándwich. El marcador es unido covalentemente al BNPh, o al fragmento de BNPh, utilizando técnicas conocidas. Las técnicas utilizadas usualmente incluyen la utilización de reactivos reticulantes heterobifuncionales, los cuales reaccionan con aminas primarias, sulfhidrilos o grupos carboxilo. Por ejemplo, puede ser utilizado succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato para unir glucosa oxidasa, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa o fosfatasa alcalina a péptidos conteniendo grupos sulfhidrilo libres. La biotina puede ser conjugada con grupos sulfhidrilo libres utilizando BMCC, con grupos carboxilo utilizando biotin hidrazida, o con grupos amino utilizando N-hidroxisuccinimida. La separación del complejo anticuerpo-BNPh puede ser realizada convenientemente por medio de la unión del anticuerpo a un soporte sólido, como los mencionados previamente en relación con el formato de ensayo tipo sándwich. A continuación, el complejo anticuerpo-BNPh es separado convenientemente al separar los restos de muestra de fluido biológico del soporte sólido.

El péptido marcado que es utilizado para competir con el BNPh en la muestra para unirse con el anticuerpo monoespecífico puede ser BNPh intacto 1-32 o cualquier fragmento peptídico del mismo, siempre que el fragmento contenga, al menos, esa secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo reconocido por el anticuerpo monoespecífico. De esta forma, cuando el anticuerpo utilizado es monoespecífico para el epítipo que consiste en los aminoácidos 1-10 del BNPh, el fragmento peptídico marcado puede ser cualquier fragmento conteniendo, al

menos, los aminoácidos 1-10, incluyendo, aunque sin estar limitado a los mismos, los péptidos de la fórmula II y los péptidos de la fórmula I, en los cuales X¹ es S-P-K-M-. Cuando el anticuerpo empleado es monoespecífico para el epítipo que consiste en los aminoácidos 5-13 del BNPh, el fragmento peptídico marcado puede ser cualquier fragmento conteniendo, al menos, los aminoácidos 5-13, incluyendo, aunque sin estar limitado a los mismos, los péptidos de la fórmula I. Cuando el anticuerpo utilizado es monoespecífico para el epítipo que consiste en los aminoácidos 15-25 del BNPh, el fragmento peptídico marcado puede ser cualquier fragmento conteniendo, al menos, los aminoácidos 15-25, incluyendo, aunque sin estar limitado a los mismos, los péptidos de la fórmula III.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos están pensados para ilustrar adicionalmente la práctica de la invención y no han de ser interpretados como limitadores en ningún modo del ámbito de la invención.

1. Preparación de Conjugados de BNP para la Producción de Anticuerpos

El BNPh 1-32 y los fragmentos BNPh 1-10 y BNPh 26-32 fueron preparados por medio de síntesis en fase sólida. Estos péptidos fueron acoplados a la proteína portadora de albúmina sérica bobina (BSA) a través de un procedimiento de acoplamiento con carbodiimida, o utilizando el reactivo reticulador heterobifuncional éster de N-maleimido-L-aminocaproil de 1-hidroxisuccinimida-2-nitro-4-ácido benzenosulfónico (mal-sac-HNSA), conforme al método de Aldwin y Nitecki (*Anal. Biochem.*, 164:494-501, 1987). Fue hecha reaccionar la BSA (1 mg) con 0,5 mg del reticulador mal-sac-HNSA en 250 μ L de solución salina con tampón de fosfato (PBS), pH 7,5, durante 40 minutos a temperatura ambiente. La BSA activada fue purificada utilizando una columna G-25 Sephadex con 0,1M de tampón fosfato, pH 6,0, y combinada con aproximadamente 1 mg de los péptidos conteniendo cisteína de BNPh 1-10 (SPKMQVQSGC) y BNPh 26-32 (CKVLRH). Se hizo reaccionar la mezcla durante 4 horas a temperatura ambiente y fue dializada durante la noche contra PBS a 4°C. Fue indicada una conjugación exitosa por medio de la presencia de una proteína en un área correspondiendo a de 75 Kd a 90 Kd en un gel de poliacrilamida al 12%.

Los conjugados de BNP 1-32 y BSA fueron preparados por medio de la disolución de aproximadamente 1 mg de BNP en 450 μ L de 1mM de HCl y añadiendo 2,8 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Se hizo reaccionar la mezcla durante 30 minutos en hielo y fue añadida a 1,47 mg de BSA en 300 μ L de 5mM de NaOH. Después de 4 horas a temperatura ambiente la solución fue dializada contra PBS a 4°C.

Los conjugados de BNPh 1-32 para la preparación de anticuerpos policlonales de conejo fueron preparados al mezclar 100 μ g de BSA metilada (MeBSA) con 100 μ g de BNPh 1-32 en 100 μ L de PBS, pH 7,4.

2. Inmunizaciones

Para la producción de anticuerpos monoclonales fueron inmunizados ratones con emulsiones de conjugado peptídico, preparadas utilizando el Sistema Adyuvante RIBI (RIBI Immunochemical Research Inc.). Fueron secados en un pequeño homogeneizador de cristal alrededor de 700 μ g de Dicorinomicolato Trealosa Sintético y alrededor de 650 μ g de Monofosforil Lípido A de S. minnesota R595 disueltos en cloroformo:metanol (4:1). Fueron añadidas sesenta μ L de escualeno y mezcladas hasta conseguir una pasta. A continuación fue añadido el conjugado peptídico con un agitado continuo, y fueron añadidos adicionalmente con agitado 1,5 mL de Tween 80 al 0,2% en agua, con el fin de generar una emulsión final conteniendo aproximadamente 1 mg/mL de proteína. La emulsión fue almacenada a 4°C hasta su utilización. Ratones Balb/c hembras (de 4 a 6 semanas de edad) fueron inyectados intraperitonealmente con aproximadamente de 125 a 150 μ g del conjugado peptídico. A los ratones se les revacunó con inyecciones intraperitoneales una vez cada 3 semanas hasta que fueron establecidos títulos viables. Los ratones recibieron una última revacunación cuatro días antes de las fusiones de células del bazo.

Para la producción de anticuerpos policlonales se inmunizó a conejos con los conjugados de BNPh 1-32 y MeBSA. Las emulsiones fueron preparadas mezclando a fondo 100 μ L del conjugado peptídico con 200 μ L del Adyuvante Completo de Freund (FCA) o con el Adyuvante Incompleto de Freund (FIA). Fueron inyectadas trescientas μ L de la emulsión de FCA en los nódulos linfáticos inguinales, siguiendo el método de Mojsov *et al.*, (*J. Biol. Chem.*, 261:11880:11889). El péptido emulsificado en FIA fue utilizado para revacunaciones adicionales en las semanas 2 y 3. Los animales fueron analizados y desangrados cuando los títulos fueron los suficientes. Fueron empleados anticuerpos policlonales procedentes de dos animales, identificados como n° 4024 y n° 4360, en algunos de los ensayos descritos más abajo.

3. Fusiones de células de bazo

Células de bazo fueron fusionadas con el mieloma progenitor FOX-NY (ATCC CRL-1732) conforme a un método modificado de Galfre *et al.*, *Nature*, 266:550, 1977. Los bazos fueron separados asépticamente y fueron preparadas suspensiones de célula única en un medio libre de suero por medio de homogenización en un homogeneizador de cristal de 7 mL. Las células de bazo fueron lavadas dos veces antes de ser mezcladas con las células progenitoras de mieloma. Las células FOX-NY:mieloma fueron recolectadas en la fase exponencial de crecimiento, lavadas y combinadas con las células del bazo en una proporción de 5:1 (célula del bazo:mieloma). Las células fueron

centrifugadas, se retiró el medio de cultivo y se aflojó el paquete celular por medio de paracentesis. Fue añadido 1 mL de glicol de polietileno (PEG) al 50% y fue agitado con suavidad a 37°C durante aproximadamente 2 minutos. Las células fueron diluidas lentamente con 10 mL de medio libre de suero, centrifugadas a 400 x g y resuspendidas en medio de selección de hibridoma: medio de cultivo RPMI-1640 de hibridoma, 10 mM de HEPES, suero bovino fetal 20%, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina, 75 µM de adenina, 0,8 µM de aminopterina y 16 µM de timidina. Las células fueron transferidas a un matraz de cultivo T-150 e incubadas durante la noche con anterioridad a su colocación en placas de 96 pocillos (alrededor de 10⁵ células por pocillo). Se mantuvieron los cultivos a 37°C, 7% CO₂, en un incubador humidificado. Se volvió a alimentar a las células 6 días después de la fusión y fue ensayado un medio condicionado para anticuerpos en el día 10.

4. Escrutinio y Selección

Los sobrenadantes del hibridoma fueron testados para determinar la reactividad al BNPh 1-32, o a distintos péptidos de BNPh, por medio de un método ELISA estándar. Los péptidos, 0,1-0,5 µg/100 µL/pocillo en PBS, fueron adsorbidos sobre placas de microtítulo durante la noche a 4°C. Los pocillos fueron lavados con PBS/Tween (PBS conteniendo Tween-20 al 0,05%) y bloqueados con gelatina 0,1% 1 hora a 37°C. Los sobrenadantes no diluidos del hibridoma (100 µL/pocillo) fueron añadidos a los pocillos recubiertos con el péptido durante 2 horas a 37°C. Los pocillos fueron lavados e incubados con un conjugado de peroxidasa de rábano picante/cabra anti-ratón IgG, diluido en PBS/Tween/ovoalbúmina (ovoalbúmina al 0,1% en PBS/Tween) durante 2 horas adicionales. Otro lavado fue seguido de la adición del sustrato (0,5 mg/mL de o-fenilenediamina, peróxido de hidrógeno al 0,012% en 100 mM de tampón fosfato cítrico, pH 5,0). La reacción de coloración fue detenida con 5 M de ácido sulfúrico y la absorbancia fue leída a 490 nm. Un valor O.D. mayor que dos veces el de fondo fue considerado como una respuesta positiva.

Los hibridomas que dieron resultado positivo en la prueba fueron reclonados por medio de dilución limitadora y sus sobrenadantes vueltos a testar para determinar la reactividad específica. Fueron establecidos el hibridoma y la estabilidad secretora por medio de la medición de las características de crecimiento y de la producción de anticuerpos a lo largo de los distintos pasos. Este proceso dio como resultado el establecimiento de la línea celular hibridoma 106.3 y MAb 106.3, la cual reconoce específicamente el fragmento peptídico 5-13 de BNPh, la línea celular hibridoma 201.3 y MAb 201.3, la cual reconoce específicamente el fragmento peptídico 1-10 de BNPh y la línea celular hibridoma 8.1 y MAb 8.1, la cual reconoce específicamente el fragmento peptídico 27-32 de BNPh. La línea celular hibridoma 106.3 fue depositada en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. el 14 de febrero de 1996, y tiene el número de entrada HB 12044. La línea celular hibridoma 201.3 fue depositada en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. el 14 de febrero de 1996, y tiene el número de entrada HB 12045. La línea celular hibridoma 8.1 fue depositada en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. el 21 de febrero de 1996, y tiene el número de entrada HB 12050.

5. Caracterización de Anticuerpos

Fue utilizada una placa de microtítulo ELISA para identificar la clase/subclase de los anticuerpos monoclonales. Fue añadido anticuerpo murino a las placas de microtítulo recubiertas previamente con BNPh. Fueron añadidos anticuerpos secundarios específicos de la subclase conjugados con peroxidasa de rábano picante, con el fin de detectar el anticuerpo monoclonal murino unido. Varios lavados, seguidos de la adición de sustrato TMB, proporcionaron reactividades específicas de la subclase para los tres monoclonales. Se determinó que el MAb 106.3 es un anticuerpo IgG_{1K}, se determinó que el MAb 201.3 pertenece a la subclase IgG_{2aK}, y se determinó que el MAb 8.1 pertenece a la subclase IgG_{1K}.

Fue testado el anticuerpo policlonal de conejo para determinar la reactividad al BNPh 1-32, así como a una variedad de fragmentos del BNPh. Placas de microtítulo fueron recubiertas con 100 ng de distintos péptidos/pocillo en 200 µL de 0,1 M de tampón bicarbonato, pH 8-9. Las placas fueron bloqueadas con gelatina al 0,1% durante 30 minutos a 37°C. Fue diluido suero de conejo 1:1000, seguido de 5 diluciones triples en un tampón Tris/Tween/BSA (0,05 M de Tris, pH 7,5, 0,15 M de NaCl, BSA al 1%, Tween-20 al 0,1%). Fueron añadidos cien microlitros de la serie de dilución del anticuerpo a los pocillos de microtítulo e incubados a 4°C durante 2 horas. A un lavado con tampón Tris/Tween/BSA le siguió incubación durante 1 hora con peroxidasa de rábano picante/cabra anti-ratón. Los pocillos fueron lavados con tampón 4 veces y fueron añadidas 200 µL de sustrato TMB. Después de una incubación de 30 a 45 minutos la reacción fue detenida con 2,5 M de ácido sulfúrico y el O.D. fue leído a 450 nm. La reactividad con los distintos péptidos es presentada en la Fig. 2. El antisuero de conejo demostró reactividades específicas a cuatro fragmentos peptídicos de BNPh, 1-10, 5-13, 15-25 y 27-32, así como una fuerte reactividad al BNPh 1-32.

6. Producción del Anticuerpo y Purificación

Fueron sembradas células hibridoma en botellas roller en una concentración de 300.000 células/mL en medio de cultivo tisular RPMI 1640 suplementado con Fetal Clon (Hyclone) al 5% y cultivadas hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 1 x 10⁶ células/mL. El medio fue reemplazado por medio SFM de Hibridoma libre de suero y se continuó con la incubación de 3 a 5 días más. Las células fueron separadas del medio de cultivo por medio de centrifugación a 400 x g, y el medio fue clarificado por medio de filtrado a través de un filtro de 0,2 µ. El medio fue

aplicado a una columna de afinidad Prosep Protein-A (Bioprocessing Inc.) que había sido previamente equilibrada con tampón de unión con un pH de 8,6 (1 M de glicina, 0,15 M de NaCl). Después de que se completó la aplicación del medio de cultivo, la columna fue lavada con tampón de unión hasta que las lecturas de OD monitorizadas a 280 nM volvieron a niveles base. El anticuerpo fue eluido utilizando 100 mM de ácido cítrico pH 3,0, concentrado hasta aproximadamente 1 mg/mL en un concentrador Centriprep 10 y dializado durante la noche a 4°C contra PBS, pH 7,5. El antisuero de conejo fue limpiado de lípido antes de la purificación en columna del IgG policlonal. Cada 1,5 partes de suero fue mezclada con 1 parte de Reactivo SeroClear (Calbiochem), agitada con vórtice durante aproximadamente 1 minuto y centrifugada para separar las fases lipídica y acuosa. El suero limpiado fue cargado entonces directamente en la columna con una bomba de perfusión y purificado de la misma manera que el fluido sobrenadante de cultivo tisular.

El anticuerpo de conejo específico del epítipo de BNPh comprendiendo los aminoácidos 15-25 fue aislado del IgG policlonal utilizando una columna de afinidad diaminodipropilamina (DADPA), a la cual fue inmovilizado el fragmento de BNPh sintético 15-27. Fue preparado el gel DADPA para acoplamiento por medio de lavado con 5 mL de agua, seguido de 5 mL de 0,1 M tampón MES (2-(N-morfolino)ácido etanosulfónico, NaCl 0,9%, pH 4,7. El BNPh 15-27 (2 mg) fue disuelto en 2 mL de tampón MES y mezclado con el gel. Fue añadido al gel EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) disuelto en tampón MES, e incubado con agitado durante 3 horas a temperatura ambiente. La columna fue lavada varias veces con 1 M de NaCl con el fin de eliminar el péptido no unido y fue bloqueada con ovoalbúmina al 0,1%. Con anterioridad a la aplicación del IgG de conejo, la columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 7,5. El IgG de conejo fue sometido a 5 ciclos de columna, seguido de 5 lavados con tampón PBS. Los anticuerpos unidos al BNPh 15-27 fueron eluidos con 0,1 M de glicina HCl, pH 2,5, llevados hasta pH 7,5 con 2 M de tampón Tris y concentrados en un Centriprep 10.

7. Preparación de los MABs 106.3, 201.3 y 8.1 Biotinilados

Los anticuerpos monoclonales fueron dializados contra 0,1 M de tampón borato sódico, pH 8,8, y llevados hasta una concentración final de 1 a 3 mg/mL. Fue preparada amino-hexanoil-biotin-N-hidroxisuccinimida en dimetil sulfóxido en una concentración de 10 mg/mL y añadida a los anticuerpos en una proporción de 200 µg de éster biotín/mg MAb. El conjugado fue llevado a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas. El material no acoplado fue retirado del anticuerpo conjugado por medio de diálisis contra solución salina tamponada con fosfato.

8. Análisis del Epítipo

Los epítipes de BNPh que reaccionan con MAb 201.3, MAb 106.3 y MAb 8.1 fueron determinados utilizando un ELISA de inhibición. Fue utilizado BNPh biotinilado con una única biotina en el aminoácido N-terminal durante la síntesis de fase sólida como el indicador para los estudios competitivos con MAb 106.3 y MAb 8.1. El BNPh biotinilado en los dos residuos de cisteína, 10 y 26, fue preparado por medio del acoplamiento con el reactivo de biotinilación reactivo al sulfhidrilo, Biotin-BMCC. Este reactivo fue necesario para completar los estudios de inhibición con el MAb 201.3.

Placas de microtítulo fueron recubiertas con IgG anti-ratón de cabra (específico de F_c) (0,5 µg/100 µL/pocillo en tampón bicarbonato, pH 9 durante 2 horas a 37°C). Los pocillos fueron lavados cuatro veces con tampón de lavado (0,05 M de Tris, pH 7,5, 0,15 M de NaCl, Tween-20 al 0,05%). Los anticuerpos monoclonales purificados 106.3, 201.3 y 8.1 fueron diluidos en tampón de ensayo (0,05 M de Tris, pH 7,5, 0,15 M de NaCl, Tween-20 al 0,1% y BSA al 1%) y 180 pg/100 µL/pocillo fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados con tampón de lavado. Varios fragmentos peptídicos distintos de BNPh fueron mezclados en tampón de ensayo con el BNPh 1-32 biotinilado en una proporción molar de 100:1 (fragmento peptídico: BNPh biotinilado), añadidos a los pocillos de microtítulo e incubados durante 1,5 horas a 4°C. Los pocillos fueron lavados una vez con tampón de lavado, fue añadida estreptavidina-peroxidasa de rábano picante en 100 µL de tampón de ensayo y fueron incubados durante 20 minutos a 4°C. Las placas fueron lavadas 4 veces con tampón de lavado y fueron añadidas 200 µL de substrato TMB, e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción de coloración con 2,5 M de ácido sulfúrico y los valores de O.D. fueron leídos a 450 nm.

Los resultados del análisis epitópico para MAb 106.3, MAb 201.3 y MAb 8.1 son presentados en la Fig. 3. La unión del biotín-BNPh 1-32 se vio inhibida de forma significativa por los fragmentos de BNPh específicamente reactivos con los anticuerpos monoclonales. Para MAb 106.3 el fragmento más pequeño de BNPh capaz de producir una inhibición comparable a la del BNPh 1-32 de longitud total fue el fragmento peptídico BNPh 5-13. Para MAb 201.3, el fragmento peptídico más pequeño de BNPh produciendo una inhibición comparable a la vista con el BNPh 1-32 fue el fragmento de BNPh, BNPh 1-10. Para MAb 8.1, el fragmento peptídico de BNPh más pequeño produciendo una inhibición comparable a la vista con el BNPh 1-32 fue el fragmento BNPh 27-32. De esta forma, los fragmentos de BNPh 1-10, 5-13 y 27-32 representan los epítipes de BNPh específicamente reconocidos por MAb 201.3, MAb 106.3 y MAb 8.1, respectivamente. Estos datos indican también que los fragmentos de BNPh apropiados, cuando son utilizados en un ensayo competitivo con el anticuerpo apropiado, pueden proporcionar un reactivo alternativo a la sonda de BNPh de longitud total como un indicador de inhibición.

9. Ensayo para BNPh utilizando MAb 106.3 en un ensayo tipo sándwich Monoclonal:Policlonal

Placas de microtítulo fueron recubiertas con MAb 106.3 en 100 ng/200 µL/pocillo en tampón bicarbonato, pH 9, y se permitió la adsorción durante 2 horas a 37°C. El BNPh fue diluido en tampón ensayo a 12,8 ng/mL y fueron preparadas diluciones dobles en serie con el fin de producir una curva estándar decreciente hasta 12,5 pg/mL. El tampón fue eliminado de las placas y fueron añadidas a los pocillos 100 µL de alícuotas de la serie de dilución de BNPh. Las placas fueron incubadas durante la noche a 4°C, lavadas una vez con tampón de lavado, e incubadas con 200 µL de una dilución 1:2.500 de antisuero de conejo conteniendo anticuerpos policlonales de BNPh. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a 37°C, lavadas 4 veces con tampón de lavado y fueron añadidas 200 µL/pocillo de peroxidasa de rábano picante anticonejo de cabra. Se continuó con la incubación a 37°C durante 2 horas adicionales. Las placas fueron lavadas 4 veces con tampón de lavado, fueron añadidas 200 µL de substrato TMB y se continuó con la incubación de 5 a 30 minutos. La reacción de coloración fue detenida con 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y fue medida la O.D. a 450 nm. Fue preparada una curva estándar al plotear la O.D. contra pg/pocillo de BNPh. La curva estándar es presentada en la Fig. 4.

10. Ensayo para BNPh utilizando MAb 201.3 en un ensayo tipo sándwich Monoclonal:Policlonal

Las placas fueron recubiertas con 400 ng/pocillo de MAb 210.3 en tampón de bicarbonato durante la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas con tampón de lavado y bloqueadas con tampón de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente. El BNPh fue diluido en tampón de ensayo con una concentración de 10 ng/mL y fueron preparadas diluciones cuádruples en serie con el fin de producir una curva estándar decreciente hasta 10 pg/mL. Las placas fueron vaciadas y fueron añadidas a los pocillos 100 µL de alícuotas de la serie de dilución. Se continuó con la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas una vez con tampón de lavado. Fue diluido 1:1.000 antisuero de conejo conteniendo anticuerpos policlonales de BNPh en tampón de ensayo, fueron añadidas 100 µL a los pocillos e incubados a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de tres lavados con tampón de lavado, fueron añadidas 100 µL/pocillo de peroxidasa de rábano picante anticonejo de cabra y se continuó con la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas fueron lavadas 3 veces con tampón de lavado, fue añadido substrato TMB y se permitió que continuara la coloración durante 20 minutos. La reacción fue detenida con 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y fue medida la O.D. a 450 nm. La curva estándar producida por estas diluciones en serie de BNPh es presentada en la Fig. 5.

11. Ensayo de tipo sándwich utilizando MAb 106.3 y BNPh 15-25 de reconocimiento policlonal mono específico

Placas de microtítulo fueron recubiertas con MAb 106.3 en 100 ng/100 µL/pocillo en tampón bicarbonato, pH 9, durante la noche a 4°C. El BNPh fue diluido en tampón ensayo a 10 ng/mL y fueron utilizadas diluciones dobles en serie con el fin de preparar una curva estándar decreciente hasta 10 pg/mL. Las placas fueron lavadas y bloqueadas durante 1 hora con tampón de ensayo. Fueron añadidas a los pocillos cien alícuotas de microlitro de la serie de dilución de BNPh, e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados 4 veces con tampón de lavado y fueron añadidas 100 µL de una dilución 1:50 de IgG de conejo mono específico para BNPh 15-25. Las placas fueron incubadas durante 2 horas, lavadas 4 veces con tampón de lavado y fueron añadidas 200 µL/pocillo de peroxidasa de rábano picante anticonejo de cabra. Se continuó con la incubación durante 30 minutos. Las placas fueron lavadas 4 veces con tampón de lavado, fueron añadidas 200 µL de substrato TMB y se permitió que se produjera la coloración durante 10 minutos. La reacción de coloración fue detenida con 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y fue medida la O.D. a 450 nm. Fue preparada una curva estándar al plotear la O.D. contra pg/pocillo de BNPh. La curva estándar es presentada en la Fig. 6.

12. Ensayo tipo sándwich utilizando MAb 201.3 y BNPh 15-25 de reconocimiento policlonal mono específico

Placas de microtítulo fueron recubiertas con MAb 201.3 en 400 ng/100 µL/pocillo en tampón bicarbonato, pH 9, durante la noche a 4°C. El BNPh fue diluido en tampón ensayo a 10 ng/mL y fueron utilizadas diluciones dobles en serie con el fin de preparar una curva estándar decreciente hasta 10 pg/mL. Las placas fueron lavadas y bloqueadas durante 1 hora con tampón de ensayo. Fueron añadidas a los pocillos cien alícuotas de microlitro de la serie de dilución de BNPh, e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados 4 veces con tampón de lavado y fueron añadidas 100 µL de una dilución 1:50 de IgG de conejo mono específico para BNPh 15-25. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente, lavadas 4 veces con tampón de lavado y fueron añadidas 200 µL/pocillo de peroxidasa de rábano picante anticonejo de cabra. Se continuó con la incubación durante 30 minutos. Las placas fueron lavadas 4 veces con tampón de lavado, fue añadido substrato TMB y se permitió que se produjera la coloración durante 10 minutos. La reacción de coloración fue detenida con 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y fue medida la O.D. a 450 nm. Fue preparada una curva estándar al plotear la O.D. contra pg/pocillo de BNPh. La curva estándar es presentada en la Fig. 7.

13. Ensayo tipo sándwich para BNPh utilizando MAb 8.1 y MAb 106.3

Placas de microtítulo fueron recubiertas con 100 ng/pocillo de MAb 8.1 en 200 µL de tampón bicarbonato durante la noche a 4°C. Los pocillos fueron lavados con tampón de lavado y bloqueados durante 1 hora a 4°C. El BNPh fue diluido en tampón de ensayo a 10 ng/mL y fueron preparadas diluciones dobles en serie con el fin de producir una

curva estándar decreciente hasta aproximadamente 10 pg/mL. El tampón fue retirado de los pocillos y fueron añadidas 100 µL de alícuotas de la serie de dilución estándar de BNPh, y fueron añadidas 100 µL de tampón de ensayo conteniendo 10 ng del MAb 106.3 biotinilado. Las placas fueron incubadas a 4° C durante 1,5 horas. Las placas fueron lavadas tres veces con tampón de lavado y fueron añadidas a cada pocillo 200 µL de una dilución 1:3.000 de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Se continuó con la incubación durante una hora adicional a 4°C. Los pocillos fueron lavados cuatro veces con tampón de lavado, fueron añadidas 200 µL de sustrato TMB y se continuó con la incubación de 5 a 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción de coloración fue detenida con 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y fue medida la O.D. a 450 nm. Fue preparada una curva estándar al plotear la O.D. contra pg/pocillo de BNPh. La curva estándar es presentada en la Fig. 8.

14. Ensayo tipo sándwich para BNPh utilizando MAb 201.3 y MAb 8.1

Placas de microtítulo fueron recubiertas con 400 ng/pocillo de MAb 201.3 en 200 µL de tampón bicarbonato durante la noche a 4°C. Los pocillos fueron lavados tres veces con tampón de lavado y bloqueados durante 1 hora. El BNPh fue diluido en tampón de ensayo a 100 ng/mL y 10 ng/mL, y fueron preparadas diluciones cuádruples en serie con el fin de producir una curva estándar decreciente hasta aproximadamente 10 pg/mL. El tampón fue retirado de los pocillos y fueron añadidas 100 µL de alícuotas de la serie de dilución estándar de BNPh. La incubación fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las placas fueron lavadas tres veces con tampón de lavado y fueron añadidas a cada pocillo 100 µL de tampón de ensayo conteniendo 10 ng de MAb 8.1 biotinilado. Se continuó con la incubación durante 1,5 horas adicionales a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados tres veces con tampón de lavado y fueron añadidas a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:3.000 de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Se continuó con la incubación durante una hora adicional a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados tres veces con tampón de lavado. Fue añadido sustrato TMB (200 µL) e incubado a temperatura ambiente de 5 a 30 minutos. La reacción de coloración fue detenida con 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y fue medida la O.D. a 450 nm. Fue preparada una curva estándar al plotear la O.D. contra pg/pocillo de BNPh. La curva estándar es presentada en la Fig. 9.

15. Ensayo Competitivo utilizando MAb 106.3

Los reactivos utilizados en este ensayo incluyeron MAb 106.3, reactivo competitivo BNPh 1-32 biotinilado y un diluyente de plasma capaz de controlar la interferencia de la muestra del paciente. El diluyente de plasma puede ser preparado de pool de plasma humano o de pool de suero humano. La preparación partiendo del plasma implica la inducción de coágulos al añadir 2 mg/mL de cloruro cálcico, la incubación a temperatura ambiente para promover la coagulación y la degradación de BNPh endógeno, diálisis utilizando entubación de diálisis de corte a 15.000 MW contra 0,001 M de tampón fosfato conteniendo 0,15 M de NaCl, la retirada del material coagulado, la adición de EDTA en una concentración de 1,5 mg/mL y el filtrado a través de un filtro de 0,2 µ. Debido a la susceptibilidad del BNPh para la degradación proteolítica, es importante añadir un inhibidor de proteasa como el 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil fluoruro, HCl (1mM al diluyente de plasma y tampón de ensayo). Fueron preparadas placas de microtítulo al añadir 200 µL/pocillo de anticuerpo anti-murino de cabra (F_c específico, aproximadamente 0,5 µg/pocillo) en tampón bicarbonato, pH 9, e incubando durante 2 horas a 37°C. Las placas fueron lavadas 4 veces con tampón de lavado. El MAb 106.3 fue diluido en tampón de ensayo y fueron añadidas 100 µL (90 pg/pocillo) a los pocillos microtítulo. Se continuó con la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron vaciadas y fueron añadidas 200 µL/pocillo de tampón de ensayo. El BNPh 1-32 fue diluido directamente en el diluyente de plasma utilizando diluciones dobles con el fin de producir una curva estándar variando desde 320 pg/mL hasta 5 pg/mL. Fueron añadidas muestras de cien microlitros a los pocillos, conteniendo 200 µL de tampón de ensayo, las placas fueron tapadas e incubadas durante la noche, a temperatura de 2 a 8°C, en un agitador orbital. Las muestras de plasma procedentes de pacientes fueron diluidas por lo general al menos en proporción 1:2 en diluyente de plasma antes de que fueran añadidas a los pocillos. Para los pacientes con altos niveles de BNPh, todas las diluciones muestra posteriores fueron preparadas en diluyente de plasma. Después de la incubación durante la noche, los pocillos fueron vaciados y lavados una vez con 200 µL de tampón de lavado. El biotín-BNPh fue diluido en tampón de ensayo y fueron añadidas 200 µL/pocillo (125 pg/pocillo). La incubación fue llevada a cabo durante 1 hora a una temperatura de 1-8°C en un agitador orbital. Los contenidos fueron retirados de los pocillos, fueron añadidas 200 µL de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante y se continuó con la incubación durante 30 minutos a una temperatura de 2-8°C. Las placas fueron lavadas 4-5 veces con 200 µL/pocillo de tampón de lavado y fueron añadidas 200 µL de TMB. Se continuó con la incubación a temperatura ambiente de 30 minutos a 1 hora. La reacción de coloración fue detenida añadiendo a los pocillos 100 µL de 2,5 M de ácido sulfúrico y las mediciones de O.D. fueron realizadas a 450 nm. Los valores de O.D. fueron convertidos a valores B/B₀ y fue preparada una curva estándar al plotear B/B₀ contra pg/mL de BNPh. La curva estándar es mostrada en la Fig. 10. La curva estándar proporciona un rango de trabajo de ≤ 10 a 200 pg/mL. Los niveles de BNPh en muestras de pacientes fueron determinados por medio de extrapolación de la curva estándar. Los niveles de BNPh del plasma determinados para los 15 sujetos de control y 15 pacientes con enfermedad coronaria congestiva son proporcionados en la Fig. 11.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en:

- 5 (a) la secuencia aminoacídica VQGSGCFGR del péptido natriurético cerebral humano (BNPh); o
 - (b) la secuencia aminoacídica SPKMOVQSGC de BNPh; o
 - (c) la secuencia aminoacídica MDRISSSSGLG de BNPh;
- o un fragmento del mismo que conserve la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo.

10 2. Un anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo monoclonal.

3. Un método para cuantificar la cantidad de péptido natriurético cerebral humano (BNPh) en un fluido biológico que comprende:

15 (a) poner en contacto una muestra del fluido biológico con un primer anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica VQGSGCFGR de BNPh;
 - 20 (ii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica SPKMOVQSGC de BNPh; y
 - (iii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica MDRISSSSGLG de BNPh;
- y fragmentos del mismo que conserven dicha reactividad monoespecífica,
- 25 y un segundo anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica VQGSGCFGR de BNPh;
 - 30 (ii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica SPKMOVQSGC de BNPh;
 - (iii) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica MDRISSSSGLG de BNPh;
 - (iv) un anticuerpo policlonal de elevada afinidad con BNPh;
- y fragmentos del mismo que conserven dicha reactividad monoespecífica,
- 35 en condiciones que permitan la formación de un complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo;

(b) unir un marcador cuantificable con dicho segundo anticuerpo, antes de, simultáneamente con o después de la formación del complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo; y

40 (c) determinar la cantidad de BNPh en la muestra cuantificando el marcador en el complejo primer anticuerpo-BNPh-segundo anticuerpo.

4. Un método para cuantificar la cantidad de BNPh en un fluido biológico que comprende:

45 (a) poner en contacto una muestra del fluido biológico con:

(ia) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica VQGSGCFGR de BNPh o un fragmento del mismo que conserve la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo; y

50 (iia) BNPh o un fragmento del mismo que comprende la secuencia aminoacídica VQGSGCFGR de BNPh, que tiene unido a este un marcador cuantificable, en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-BNPh;

o

(ib) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica SPKMOVQSGC de BNPh o un fragmento del mismo que conserve la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo; y

55 (iib) BNPh o un fragmento del mismo que comprende la secuencia aminoacídica SPKMOVQSGC de BNPh, que tiene unido a este un marcador cuantificable, en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-BNPh;

o

60 (ic) un anticuerpo que es monoespecífico para un epítoto peptídico que consiste en la secuencia aminoacídica MDRISSSSGLG de BNPh o un fragmento del mismo que conserve la reactividad monoespecífica de dicho anticuerpo; y

(iic) BNPh o un fragmento del mismo que comprende la secuencia aminoacídica MDRISSSSGLG de BNPh, que tiene unido a este un marcador cuantificable, en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-BNPh;

65 y

(b) determinar la cantidad de BNPh en la muestra cuantificando el marcador en el complejo anticuerpo-BNPh.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
S P K M V Q G S G C F G R K M D R I S S S S G L G C K V L R R H



FIG. 1

PÉPTIDO	Ac. POLICLONAL 4024 POLIESPECÍFICO SIN PURIFICAR	Ac. POLICLONAL 4024 MONOESPECÍFICO PURIFICADO POR AFINIDAD
	OD	OD
18-25	0,000	0,005
17-25	0,000	0,032
15-25	0,817 *	0,695 *
15-23	0,000	0,012
27-32	2,616 *	0,000
11-17	0,000	0,005
5-13	2,571 *	0,003
1-10	2,644 *	0,118
1-32	2,667 *	2,903 *

* INDICA REACTIVIDAD A BNP 1-32 Y EPÍTOPOS ESPECÍFICOS

FIG. 2

Mab 201.3		Mab 106.3		Mab 8.1	
PÉPTIDO INHIBIDOR	% INHIBICION	PÉPTIDO INHIBIDOR	% INHIBICION	PÉPTIDO INHIBIDOR	% INHIBICION
1-32	92	1-32	99	1-32	99
1-15	80	1-15	85	7-32	90
1-10	89*	3-15	85	26-32	88
1-8	33	5-15	85	27-32	85*
1-6	29	5-13	88*	28-32	5
1-4	0	5-11	4	26-31	1
2-10	0	7-32	6	1-31	1

*DESIGNA LA ESPECIFICIDAD DEL EPÍTOPO PARA CADA MAb

FIG. 3

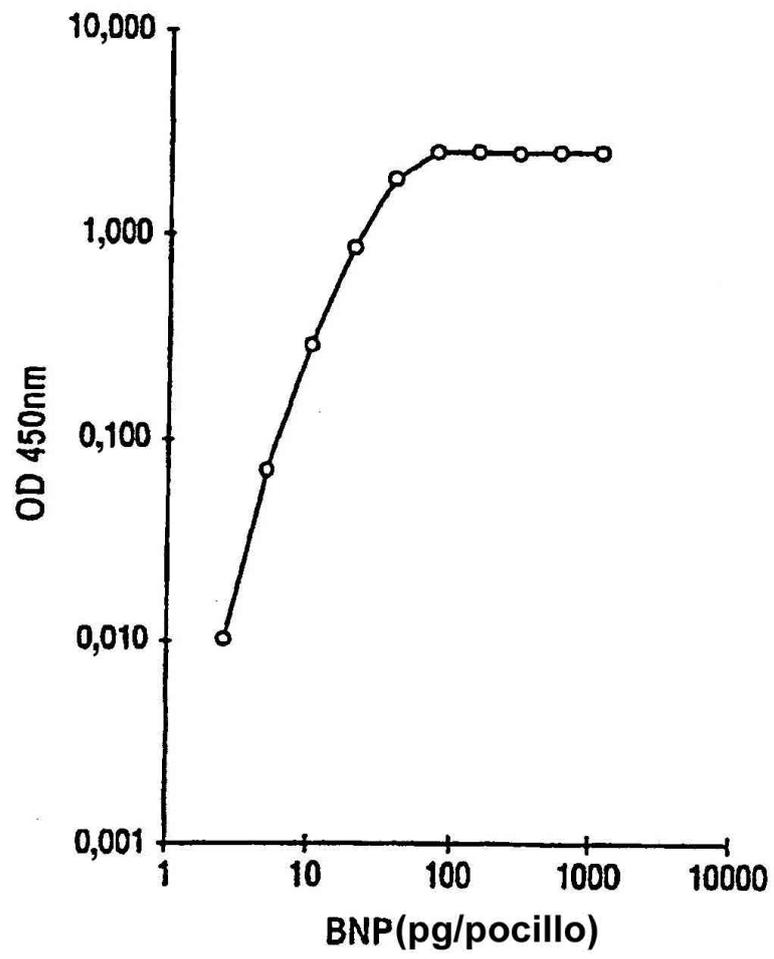


FIG. 4

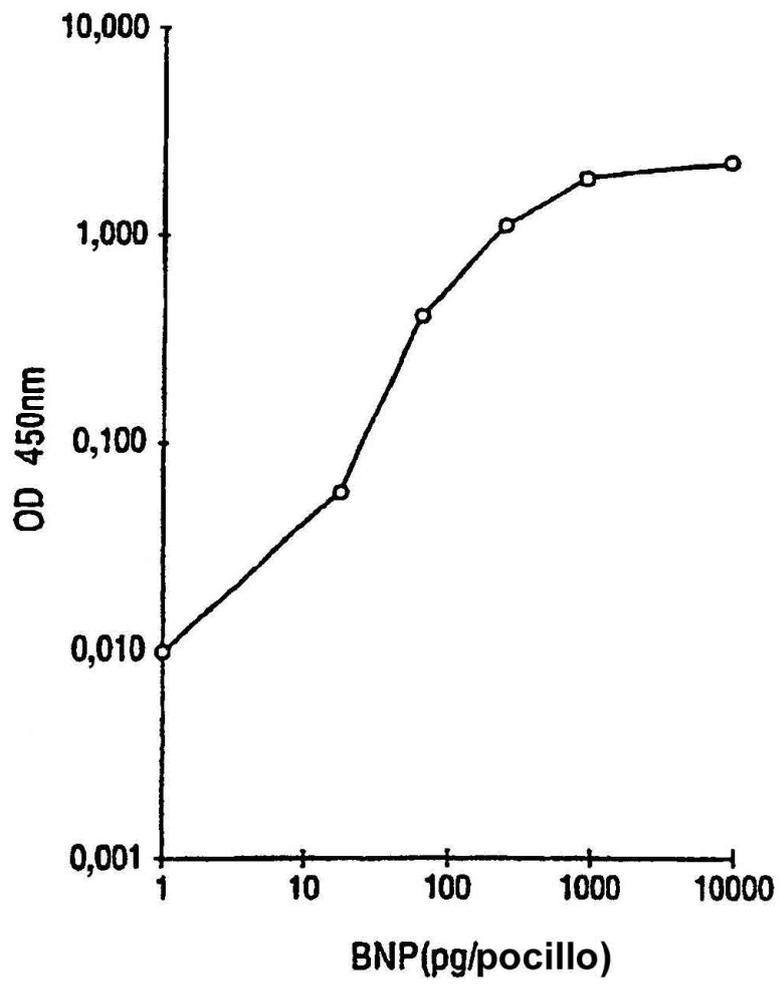


FIG. 5

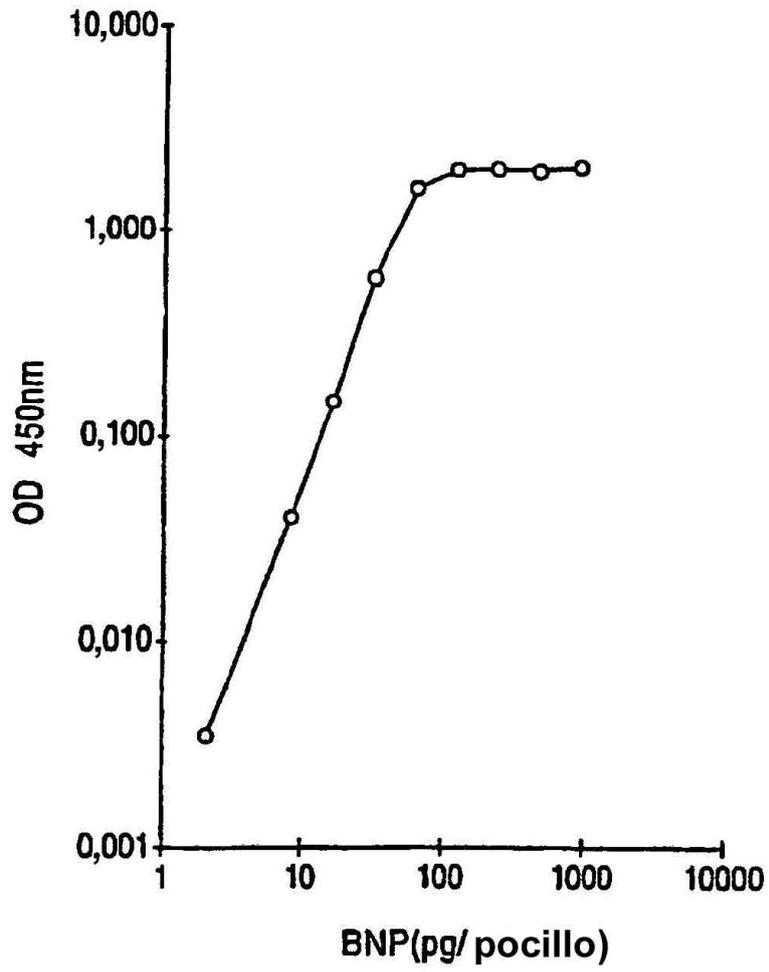


FIG. 6

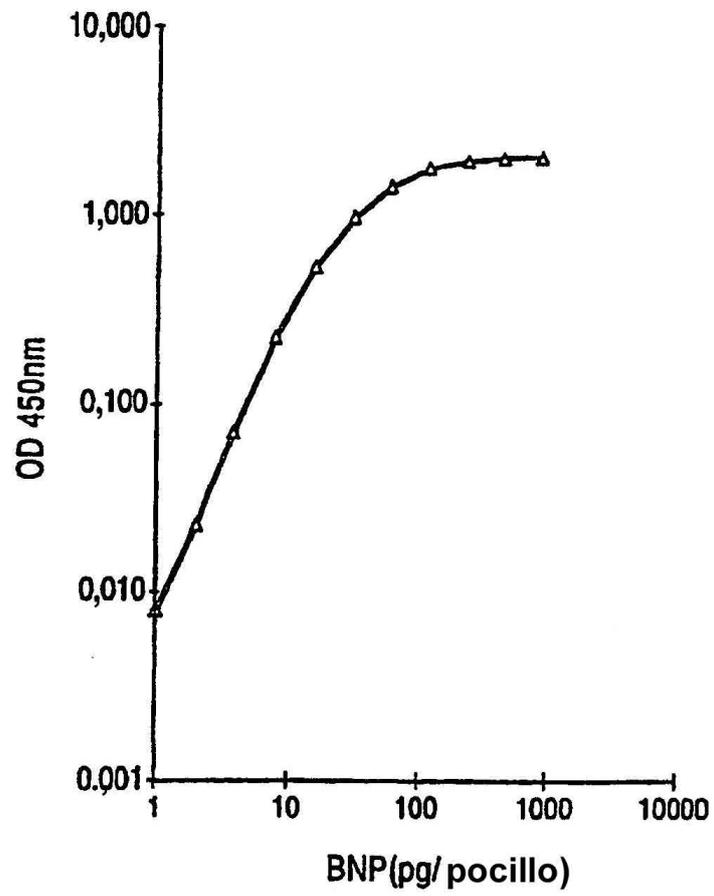


FIG. 7

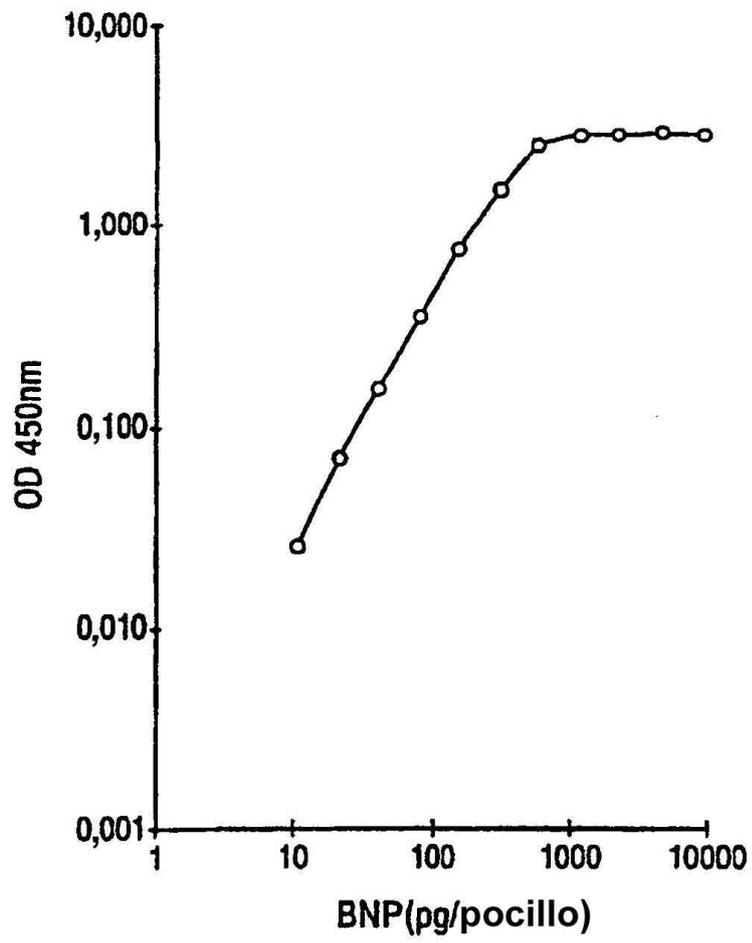


FIG. 8

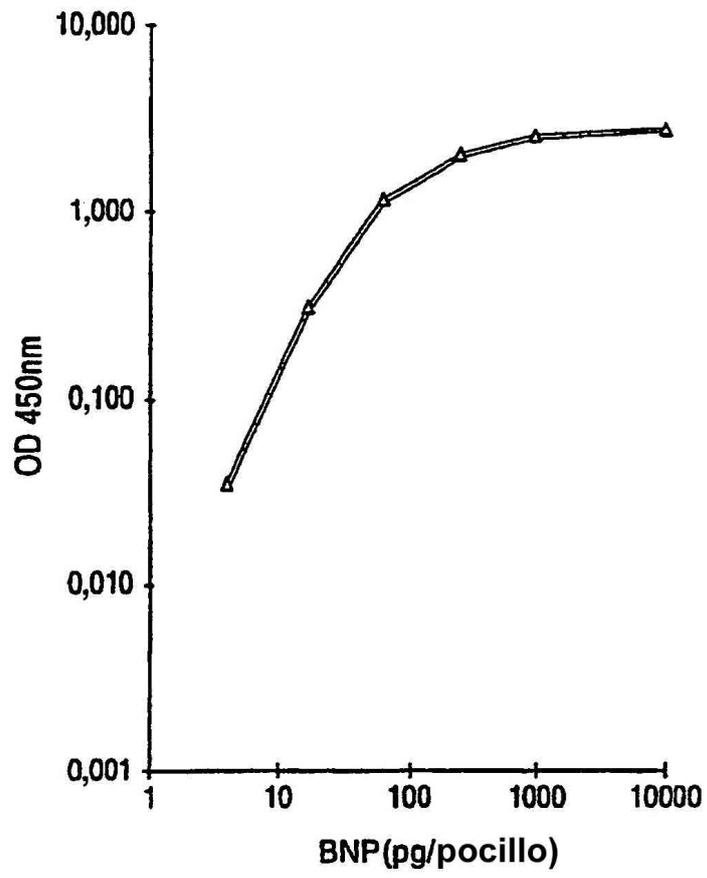


FIG. 9

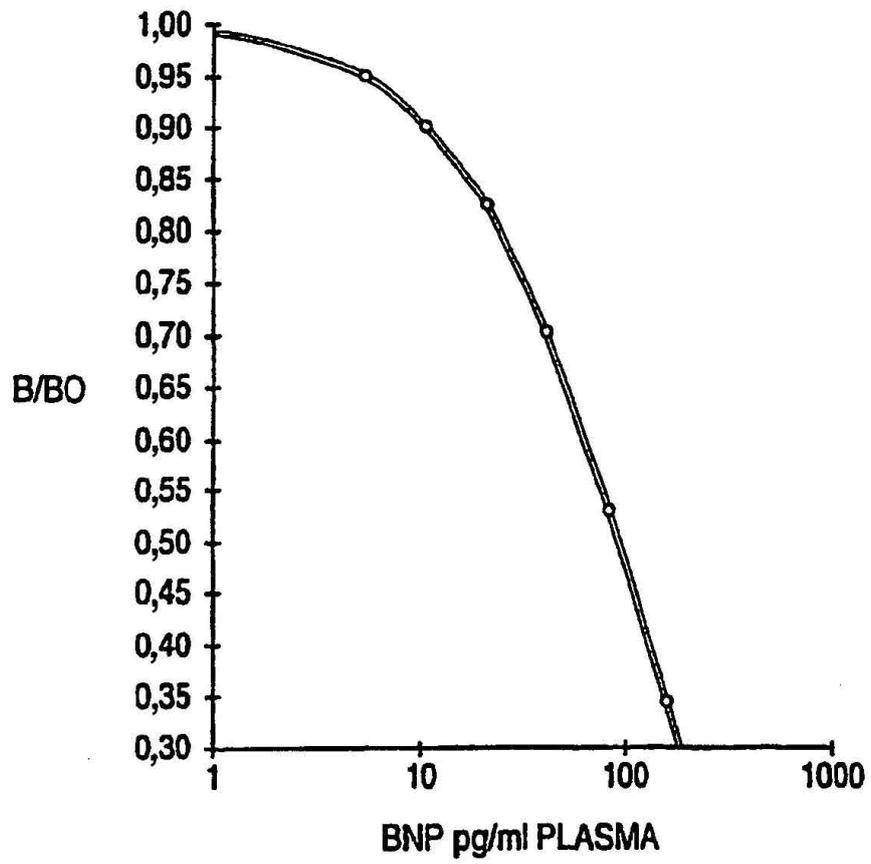


FIG. 10

NIVELES DE BNP (pg/ml)

Nº	SUJETOS CONTROL	PACIENTES CHD
1	<5	72
2	<5	1920
3	<5	473
4	5	1033
5	14,6	619
6	<5	304
7	<5	473
8	5,6	363
9	<5	416
10	<5	1142
11	<5	357
12	<5	1215
13	<5	196
14	21,1	234
15	7,7	1023

FIG. 11