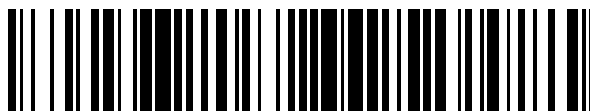


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 894**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2003** **E 10169301 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2251356**

54 Título: **Ensayo ELISA policlonal-monoclonal para detectar N-terminal del proBNP**

30 Prioridad:

18.11.2002 US 300733

04.02.2003 US 359051

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

05.05.2016

73 Titular/es:

NEXUS DX, INC. (100.0%)
6759 Mesa Ridge Road, Suite 100
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

DAVEY, MICHELLE;
JACKOWSKI, GEORGE;
KUPCHAK, PETER y
STANTON, ERIC

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 568 894 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 ELISA policlonal-monoclonal para detectar N-terminal del proBNP.

5 Campo de la invención

Esta invención se relaciona con un procedimiento de ensayo ELISA de la proteína NT-proBNP y estuche de prueba que es un ensayo *in vitro* específico y sensible para medir la concentración de NT-proBNP en los fluidos corporales, particularmente plasma humano. La invención particularmente se relaciona con un ensayo ELISA de la proteína NT-proBNP que tiene una especificidad de diagnóstico particularmente alta, por lo cual el ensayo particularmente se diseña para ser predictivo de la mortalidad como resultado de la insuficiencia cardíaca congestiva.

Antecedentes de la invención

15 El péptido natriurético tipo B (Péptido natriurético cerebral, BNP) descrito por primera vez por de Bold y otros pertenece a la familia de estructura similar, pero genéticamente distinto de los péptidos natriuréticos (NPs). (de Bold AJ. Heart atria granularity: effects of changes in water-electrolyte balance. Proc Soc Exp Biol Med 1979; 161:508-511; de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT y Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. Life Sci 1981; 28:89-94).

20 Los NP poseen propiedades potentes diuréticas, natriuréticas y vasodilatadoras y se han reportado como marcadores con valor de diagnóstico y pronóstico en la enfermedad cardiovascular, particularmente para los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) clases I-IV en la Asociación de Corazón de Nueva York (NYHA) (Boomsma F y van den Meiracker AH. Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. Cardiovasc Res 2001; 51:442-449).

El gen de *BNP* codifica para una molécula precursora con residuos de 108 aminoácidos, proBNP (Secuencia con núm. de ident. 1). Antes de la secreción por los cardiomiocitos, la escisión de esta prohormona resulta en la generación de BNP bioactivo a partir del extremo COOH. En 1995, Hunt y otros. (Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM y Espiner EA. The Aminoterminal Portion Of Probrain Natriuretic Peptide (Probnp) Circulates In Human Plasma. Biochem Biophys Res Commun 1995; 14:1175-1183; Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN y Espiner EA. Immunoreactive Amino-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide (NT-PROBNP): A New Marker Of Cardiac Impairment. Clin Endocrinol 1997; 47:287-296) demostraron que los fragmentos correspondientes a la porción N-terminal de la prohormona escindida, NT-proBNP, circulan además en el plasma, y como BNP, eran un marcador potencialmente importante, y posiblemente más exigente, de la disfunción ventricular.

Muchos estudios han demostrado la utilidad clínica de la medición de las concentraciones plasmáticas de los NP, que incluyen NT-proBNP. Los NP se han sugerido como los biomarcadores de elección para el diagnóstico y estratificación del riesgo de los pacientes con insuficiencia cardíaca (Clerico A, Del Ry S y Giannessi D. Measurement Of Cardiac Natriuretic Hormones (Atrial Natriuretic Peptide, Brain Natriuretic Peptide, And Related Peptides) In Clinical Practice: The Need For A New Generation Of Immunoassay Methods. Clin Chem 2000; 46:1529-1534; Mair J, Hammerer-Lercher A y Puschendorf B. The Impact Of Cardiac Natriuretic Peptide Determination On The Diagnosis And Management Of Heart Failure. Clin Chem Lab Med 2001; 39:571-588; Sagnella GA. Measurement And Importance Of Plasma Brain Natriuretic Peptide And Related Peptides. Ann Clin Biochem 2001; 38:83-93; Selvais PL, Donckier JE, Robert A, Laloux O, van Linden F, Ahn S, Ketelslegers JM y Rousseau MF. Cardiac Natriuretic Peptides For Diagnosis And Risk Stratification In Heart Failure: Influences Of Left Ventricular Dysfunction And Coronary Artery Disease On Cardiac Hormonal Activation. Eur J Clin Invest 1998; 28:636-642; McDonagh TA, Cunningham AD, Morrison CE, McMurray JJ, Ford I, Morton JJ y Dargie HJ. Left Ventricular Dysfunction, Natriuretic Peptides, And Mortality In Urban Population. Heart 2001; 86:21-26). Varios estudios han mostrado la utilidad de usar las mediciones de NP para identificar a los pacientes con disfunción ventricular izquierda, aun entre pacientes que son asintomáticos (es decir NYHA clase I) y se ha sugerido que las mediciones de NP como una herramienta de tamizaje pueden ayudar eficazmente a los pacientes objetivo dentro de los grupos con alto riesgo de insuficiencia cardíaca (por ejemplo, enfermedad arterial coronaria, hipertensión, diabetes, edad) que requerirán la evaluación y el seguimiento del tratamiento (Hughes D, Talwar S, Squire IB, Davies JE y Ng LL. An Immunoluminometric Assay For N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide: Development Of A Test For Left Ventricular Dysfunction. Clin Sci 1999; 96:373-80; Omland T, Aakvaag A, Vik-Mo H. Plasma Cardiac Natriuretic Peptide Determination As A Screening Test For The Detection Of Patients With Mild Left Ventricular Impairment. Heart 1996; 76:232-237; McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, y otros Biochemical Detection Of Left-Ventricular Systolic Dysfunction. Lancet 1998; 351:9-13; Schulz H, Langvik TA, Lund Sagen E, Smith J, Ahmadi N y Hall C. Radioimmunoassay For N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide In Human Plasma. Scand J Clin Lab Invest 2001; 61:33-42; Talwar S, Squire IB, Davies JE, Barnett DB y Ng LL. Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide And The ECG In The Assessment Of Left-Ventricular Systolic Dysfunction In A High Risk Population. Eur Heart J 1999; 20:1736-1744; Hystad ME, Geiran OR, Attramadal H, Spurkland A, Vege A, Simonsen S y Hall C. Regional Cardiac Expression And Concentration Of Natriuretic Peptides In Patients With Severe Chronic Heart Failure. Acta Physiol Scand 2001; 171:395-403; Hobbs FDR, Davis RC, Roalfe AK, Hare R, Davies MK y Kenkre JE. Reliability Of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Assay In Diagnosis Of Heart Failure: Cohort Study In Representative And High Risk Community Populations. BMJ 20.02; 324:1498). Los NP han mostrado tener buen valor

pronóstico en cuanto a la morbilidad y la mortalidad en la insuficiencia cardíaca. Varios estudios han demostrado además la utilidad de las mediciones de NP en la predicción de la disfunción ventricular izquierda y la supervivencia a continuación de un infarto agudo de miocardio (Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, y otros Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide And Adrenomedullin. New Neurohormonal Predictors Of Left Ventricular Function And Prognosis After Myocardial Infarction. Circulation 1998; 97:1921-1929; Luchner A, Hengstenberg C, Lowel H, Trawinski J, Baumann M, Riegger GAJ, y otros N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide After Myocardial Infarction. A Marker Of Cardio-Renal Function. Hypertension 2002; 39:99-104; Campbell DJ, Munir V, Hennessy OF y Dent AW. Plasma Amino-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Levels In Subjects Presenting To The Emergency Department With Suspected Acute Coronary Syndrome: Possible Role In Selecting Patients For Follow Up? Intern Med J 2001; 31:211-219; Nilsson JC, Groenning BA, Nielsen G, Fritz-Hansen T, Trawinski J, Hildebrandt PR, y otros Left Ventricular Remodeling In The First Year After Acute Myocardial Infarction And The Predictive Value Of N-Terminal Pro Brain Natriuretic Peptide. Am Heart J 2002; 143:696-702). El seguimiento de los niveles de NP puede proporcionar además la guía en las terapias de adaptación para cumplir con la intensidad requerida del paciente individual y en el seguimiento de la eficacia terapéutica (Richards AM, Doughty R, Nicholls G, MacMahon N, Sharpe N, Murphy J, y otros Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide And Adrenomedullin. Prognostic Utility And Prediction Of Benefit From Carvedilol In Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction. J Am Coll Cardiol 2001; 37:1781-1787; Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG y Richards AM. Treatment Of Heart Failure Guided By Plasma Aminoterminal Brain Natriuretic Peptide (N-BNP) Concentrations. Lancet 2000; 355:1126-30).

20 Técnica anterior

WO 93/24531 (US 5,786,163) otorgada a Hall describe un método inmunológico para identificar N-terminal del proBNP y los anticuerpos usados para esto. Para obtener estos anticuerpos se usan péptidos individuales producidos sintéticamente a partir de la secuencia de N-terminal del proBNP. La producción de anticuerpos por medio de la inmunización con péptidos es posible en principio, pero la afinidad con respecto a la molécula completa generalmente es demasiado baja para alcanzar la sensibilidad necesaria en un procedimiento de prueba. Adicionalmente, existe un peligro de que cuando se usan péptidos los anticuerpos obtenidos pueden, por ejemplo, identificar el C-terminal del péptido y por lo tanto sólo pueden unirse a este fragmento de la molécula completa, resultando así en anticuerpos que generalmente no se pueden unir a la molécula completa, o puede hacerlo sólo de forma limitada. En WO 93/24531 se produce un anticuerpo contra un único péptido derivado a partir de N-terminal del proBNP. Se muestra en el formato de prueba competitivo que los anticuerpos producidos se unen al péptido de inmunización (aminoácidos 47-64). Sin embargo no se muestra que los anticuerpos son capaces de unirse a N-terminal del proBNP nativo como una molécula completa en una muestra. Además, la prueba de sándwich descrita en WO 93/24531 en una muestra no se puede realizar como se describe ya que no hubo ningún material estándar adecuado y no hubo anticuerpos contra dos epítomos diferentes. Además, la prueba competitiva realizada en PCT 93/24531, donde el péptido 47-64 compite en una forma marcada como un trazador con una muestra o el péptido no marcado estándar 47-64 que se une a anticuerpos policlonales de suero de conejo, se afecta con el hecho de que sólo alcanza una competición muy moderada después de 48 horas de incubación de la que sólo puede derivarse un bajo límite de detección de aproximadamente. 250 fmol/ml. Esto no es ni suficiente para la diferenciación de los individuos sanos y pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca ni para una clasificación diferenciada de las muestras de pacientes en los grados de gravedad de la insuficiencia cardíaca. Adicionalmente, los largos tiempos de incubación de la prueba competitiva no son aceptables para las mediciones rutinarias de las muestras en laboratorios automatizados.

Hunt y otros (Clinical Endocrinology 47 (1997),287-296) describe además una prueba competitiva para la detección de N-terminal del proBNP. Para esto es necesario antes de la medición una extracción compleja de la muestra de plasma; esto puede conducir a la destrucción del analito y error de las mediciones. El antisuero usado se produce de forma análoga a WO 93/24531 mediante inmunización con un péptido sintético Hunt y otros produjo el antisuero mediante inmunización con los aminoácidos 1-13 de N-terminal del proBNP y el péptido de los aminoácidos 1-21 se usa como un estándar. Para esta prueba son necesarios también largos tiempos de incubación. Después de una incubación de 24 horas se alcanza el límite inferior de detección de 1.3 fmol/ml.

WO 00/45176, Method of Identifying N-Terminal proBNP, Karl y otros, describe anticuerpos monoclonales y policlonales aislados a través del uso de un inmunógeno de NT-proBNP recombinante. La referencia sugiere la formación de un ensayo usando los anticuerpos descritos como específicos para NT-proBNP en los fluidos corporales. Como se describirá más completamente, una comparación del área bajo la curva (AUC) de un gráfico de las Características Operativas del Receptor (ROC) para este ensayo vs. el ensayo de la presente invención indica que la presente invención demuestra rendimiento diagnóstico superior.

WO 00/35951, Natriuretic Peptide Fragments, se dirige hacia un ensayo para NT-proBNP que utiliza dos anticuerpos dirigidos hacia diferentes epítomos de la secuencia de NT-proBNP. Este ensayo tiene deficiencias similares a la de Hall (5,786,163) en que los anticuerpos se levantan contra los fragmentos del péptido sintético como el inmunógeno.

Resumen de la invención

El estuche de prueba y el ensayo ELISA de la proteína NT-proBNP descrito al instante es un ensayo *in vitro* específico y sensible que es capaz de medir la concentración de NT-proBNP en una variedad de fluidos corporales, cuyos ejemplos

no limitantes son sangre, suero, plasma, orina y similares. Los siguientes ejemplos y descripciones ejemplificarán el uso del ensayo en el plasma humano.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo o anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales de cualquier isotipo (IgA, IgG, IgE, IgD, IgM), o una porción de unión al antígeno de estos, que incluye, pero no se limita a, F (ab) y fragmentos Fv, anticuerpos de simple cadena, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y una genoteca de expresión de Fab.

En un primer aspecto la invención proporciona un estuche de prueba para determinar un nivel de N-terminal del pro-péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) en una muestra, que comprende: anticuerpos policlonales aislados específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident.: 1, y anticuerpos monoclonales aislados específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde los anticuerpos monoclonales se unen a un soporte sólido, en donde los anticuerpos policlonales y monoclonales forman un inmunocomplejo detectable con NT-proBNP en una muestra.

En un aspecto adicional la invención proporciona un método para determinar un nivel de N-terminal del pro-péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) en una muestra, el método que comprende: contactar una muestra con anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, siendo los anticuerpos policlonales específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident.: 1, y siendo los anticuerpos monoclonales aislados específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde los anticuerpos monoclonales se unen a un soporte sólido, y que cuantifican la cantidad de un inmunocomplejo formado por los anticuerpos policlonales y monoclonales con NT-proBNP en la muestra.

En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos policlonales de cabra levantados contra proBNP humano recombinante, cuyos anticuerpos se seleccionan específicamente para exhibir una afinidad específica para las secuencias de aminoácidos dirigidas dentro de proBNP humano.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un método cuantitativo para la medición de NT-proBNP humano, por lo cual se puede determinar una herramienta de diagnóstico/detección para predecir con exactitud la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva.

Es aún un objetivo adicional de la presente invención proporcionar anticuerpos monoclonales útiles al proporcionar un ensayo de diagnóstico in vitro particularmente sensible y específico cuando se combina con los anticuerpos policlonales de cabra previamente seleccionados.

Es aún un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un estuche de prueba de ELISA para el propósito de llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico/detección anteriormente descrito para determinar los niveles de NT-proBNP.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el método de selección de NT-proBNP y los péptidos objetivos a partir de una proteína precursora pre-proBNP;

La Figura 2 es una curva ROC para el ensayo policlonal de cabra/monoclonal 6G11;

La Figura 3 es un diagrama de caja de los niveles de NT-proBNP en NYHA clase III y IV vs. controles;

La Figura 4 es un diagrama de caja de los niveles de NT-proBNP en sujetos control, estratificados por la edad;

La Figura 5 describe el procedimiento ELISA para utilizar el ensayo policlonal de cabra/monoclonal 6G11 de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La prueba de ensayo ELISA de NT-proBNP emplea la técnica de ELISA sándwich para medir NT-proBNP circulante en plasma humano. Los pocillos de las microplacas recubiertos con proteína de captura policlonal de cabra anti-NT-proBNP constituyen la fase sólida. El plasma del sujeto de prueba, estándares y controles se añaden a los pocillos recubiertos y se incuban con el tampón de incubación. No se requiere etapa de extracción de la muestra. Si la proteína NT-proBNP está presente en la muestra de prueba, será capturado por el anticuerpo específico de NT-proBNP recubierto sobre los pocillos. Después de la incubación y el lavado, se añade a los pocillos un anticuerpo monoclonal detector anti-NT-proBNP. El anticuerpo detector se une a la proteína NT-proBNP o fragmentos inmunogénicos de esta, por ejemplo, fragmentos de polipéptidos que se reconocen por dicho anticuerpo, unidos al anticuerpo de captura anti-NT-proBNP, formando así un sándwich. Después de la incubación y el lavado, se añade a los pocillos un policlonal de burro anti IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP). A continuación de la incubación y lavado, se añade un sustrato enzimático a los pocillos y se incuban. Después se añade una solución ácida para detener la reacción enzimática. El grado de actividad enzimática de la HRP inmovilizada se determina mediante la medición de la densidad óptica del producto enzimático oxidado en los pocillos a 450 nm. La absorbancia a 450 nm es proporcional a la cantidad de NT-proBNP en la muestra de sujeto de prueba. Un conjunto de estándares de proteína NT-proBNP se usa para generar una curva patrón de absorbancia vs. la concentración de NT-proBNP de la cual se pueden calcular las concentraciones de

NT-proBNP en las muestras de prueba y controles. Se entiende que la detección de la inmunorreacción se puede realizar a través de métodos directos o indirectos que son bien conocidos en la técnica.

Para obtener anticuerpos con propiedades de unión específicos para las secuencias de aminoácidos dirigidas dentro de proBNP humano, se expresó proBNP humano recombinante (o rhproBNP) y se purificó para el uso como un inmunógeno. El constructo plásmido ProBNP-pUC9 se obtuvo del Dr. Adolfo J. de Bold (Instituto del Corazón de Ottawa). El marco de lectura abierto de rhproBNP de longitud completa (ORF) se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y subclonaje en pET32c (NcoI/XhoI). El vector pET32c se modificó mediante la eliminación de 81 nucleótidos de manera que la proteína de fusión final no contendría los sitios S-tag y enteroquinasa. La secuencia en el extremo N-terminal de la rhproBNP ORF consistió en etiquetas de tiorredoxina y poli-histidina y un sitio de escisión de trombina. No hubo ninguna secuencia adicional en el extremo C-terminal. La proteína se expresó en células *Escherichia coli* BL21 (DE3) y el extracto celular crudo se preparó en condiciones no desnaturizantes. La purificación por afinidad posterior se completó mediante cromatografía Ni-NTA siguiendo las recomendaciones del proveedor. Antes de las inyecciones, los niveles de endotoxina en las soluciones rhproBNP se redujeron a niveles aceptables usando una resina Detoxigel® de eliminación de endotoxina siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Producción de Anticuerpo Policlonal y Purificación:

Las cabras (raza La Mancha o Toggenburg) se inmunizaron con proBNP humano recombinante de longitud completa purificado (rhproBNP). Una inyección intramuscular primaria en múltiples sitios de 500 ug de rhproBNP purificado emulsionado en Adyuvante Completo de Freund se administró, seguido de inyecciones intramusculares bisemanal de 250ug en múltiples sitios de rhproBNP purificado emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. El título de las cabras inmunizadas se controló de forma rutinaria mediante el tamizaje de suero usando una técnica ELISA medio-sandwich.

Los anticuerpos policlonales (PAb) específicos para las secuencias de aminoácidos dentro de proBNP (1-25, 26-51, 52-76 o 77-108) de la sec. con núm. de ident.: 1 se purificaron posteriormente de suero de cabra mediante purificación por afinidad secuencial usando sefaroza-4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) acoplada, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, con las siguientes proteínas o secuencias de péptidos:

1. IgG humana (Jackson ImmunoResearch)
2. IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch)
3. Secuencia de aminoácido de proBNP #1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1 (H P L G S P G 8 A S D L E T S G L Q E Q R N H L Q) acoplada a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)
3. Secuencia de aminoácido de proBNP #26-51 de la sec. con núm. de ident.: 1 (G K L S E L Q V E Q T S L E P L Q E S P R P T G V W) acoplada a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)
4. Secuencia de aminoácido de proBNP #52-76 de la sec. con núm. de ident.: 1 (K S R E V A T E G I R G H R K M V L Y T L R A P R) acoplada a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)
5. Secuencia de aminoácido de proBNP #77-108 de la sec. con núm. de ident.: 1 (BNP-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) acoplada a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)

Los anticuerpos policlonales purificados se dializaron contra 20 mM de PBS, pH 7.4, se concentraron por ultrafiltración y almacenaron a -20 °C.

Expresión de NT-proBNP humano recombinante

Para obtener el material para el uso en la calibración de un método cuantitativo para la medición de NT-proBNP humano, se expresó y purificó NT-proBNP humano recombinante (o rhNT-proBNP). Un constructo plásmido proBNP-pUC9 se obtuvo del Dr. Adolfo J. de Bold (Instituto del Corazón de Ottawa). El rhNT-proBNP ORF se obtuvo mediante PCR y subclonaje en pET32c (NcoI/XhoI). La secuencia en el extremo N-terminal de rhNT-proBNP ORF consistió de tiorredoxina, poli-histidina, y etiquetas S-tag, así como los sitios de escisión de trombina y enteroquinasa. No hubo ninguna secuencia adicional en el extremo C-terminal. La proteína se expresó en células *Escherichia coli* BL21 (DE3) y el extracto celular crudo se preparó en condiciones no desnaturizantes. La purificación por afinidad posterior se completó mediante cromatografía Ni-NTA siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Tamizaje de los Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales, secretados por las líneas celulares de hibridoma designados en la presente descripción como 6G11-F11-D12 y como 1C3-E11-H9 para el uso en un método de inmunoensayo, en donde dichos anticuerpos son específicos al polipéptido que consiste en los aminoácidos 1-25 del N-terminal del factor natriurético cerebral humano BNP (1-25), se obtuvieron del Dr. Adolfo J. De Bold. Estos monoclonales se produjeron a partir de los sobrenadantes para usar en un ELISA de NT-proBNP en el emparejamiento con los anticuerpos policlonales de cabra descritos al instante, y se designan 6G11 y 1C3, respectivamente. Estos clones son objeto de U.S. SN 10/299,606

presentada en igual fecha que la presente, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia, y se depositaron, de acuerdo con el Tratado de Budapest, con la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 Universidad Blvd., Manassas, VA 20110-2209 el 5 de diciembre de 2002 bajo los Números de Acceso PTA-4844 y PTA-4845, respectivamente. De acuerdo con 37 CFR 1.808, los depositantes aseguran que todas las restricciones impuestas sobre la disponibilidad al público de los materiales depositados serán eliminados irrevocablemente tras la concesión de una patente. Los depositantes, además, aseguran que los materiales depositados serán reemplazados si las muestras viables no pueden ser dispensadas por el depositario. El tamizaje se llevó a cabo para:

i) MAb(s) de Captura Potencial con PAB de cabra como detector

Los sobrenadantes de cultivo de hibridomas confluentes se añadieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC, MaxiSorp, GIBCO BRL) recubiertas con inmunoglobulinas de burro anti-IgG de ratón_(H+L) (Jackson ImmunoResearch) a 2 µg/ml en 100mM de tampón de carbonato, pH 9.6. Los sitios de unión en exceso se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) en PBS, pH 7.4. Después de lavar la placa con tampón de lavado (PBS que contiene 0.05%(V/V) Tween 20), se incubó en la placa 50µL de cada sobrenadante de cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal. Después de 1 hora de incubación a 37 °C en una incubadora de CO₂, la placa se lavó con tampón de lavado. Después se añadió a la placa el proBNP (Syn-X Pharma) humano recombinante a una concentración de 3 ng/ml o 0 ng/ml y la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) sobre un agitador. Después de lavar la placa, los anticuerpos policlonales de cabra biotinilados, purificados por afinidad contra secuencias de péptidos de aminoácidos 1-25, 26-51 o 52-76 de proBNP (Syn-X Pharma), diluidos adecuadamente en PBS con 0.5%(p/v) BSA, se añadieron a los pocillos adecuados. Los anticuerpos policlonales de cabra se biotinilaron usando un estuche para el Marcage con Biotina de Roche siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente sobre un agitador, la placa se lavó y se añadió estreptavidina conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1/5000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador. Después del lavado, se añadió la solución de sustrato TMB (Moss) y al cabo de 8 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la reacción se detuvo con 1 N de H₂SO₄ y la densidad óptica se leyó a 450nm. Los clones se seleccionaron para la producción de ascitis basado en la capacidad de apareamiento con el anticuerpo policlonal de cabra respectivo para producir una señal específica de alta intensidad en los pocillos que contienen el antígeno proBNP y mínima señal en los pocillos que no contienen el antígeno proBNP.

ii) MAb(s) Detector Potencial con el PAB de cabra como Captura

Placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con anticuerpos policlonales de cabra purificados por afinidad contra secuencias de péptidos 1-25, 26-51, o 52-76 (Syn-X Pharma) a 1 µg/ml en 100mM tampón de carbonato, pH 9.6. Los sitios de unión en exceso se bloquearon como para el método (i). Después de lavar con tampón de lavado, se añadió el proBNP (Syn-X Pharma) humano recombinante a los pocillos a una concentración de 3 ng/ml o 0 ng/ml y la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un agitador. Después del lavado, se añadieron (50 µL por pocillo) sobrenadantes de cultivo del hibridoma confluyente que contienen los anticuerpos monoclonales y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en incubadora de CO₂. Después de otra etapa de lavado, se añadió a la placa anti-IgG de ratón_(H+L) de burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1/5000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador. El sustrato TMB se añadió, después de lavar, y las placas se revelaron como para el método (i). Los clones se seleccionaron para la producción de ascitis basado en la capacidad de apareamiento con el anticuerpo policlonal de cabra respectivo para producir una señal específica de alta intensidad en los pocillos que contienen el antígeno proBNP y una mínima señal en los pocillos sin el antígeno.

Selección Final del Anticuerpo Monoclonal 6G11:

A continuación de la producción de los anticuerpos monoclonales seleccionados mediante la ascitis, y la purificación posterior por Proteína G (Pharmacia) usando los procedimientos conocidos, los anticuerpos purificados se re-examinaron como se describió anteriormente para tamizar los sobrenadantes de hibridomas, sino por el hecho de que los anticuerpos monoclonales purificados se diluyeron adecuadamente en 100 mM tampón de carbonato, pH 9.6 y se recubrieron directamente sobre la placa para tamizar como captura, o adecuadamente se diluyeron en PBS que contiene 0.5%(p/v) de BSA para tamizar como detectores.

La especificidad y la sensibilidad óptimas del ELISA para el proBNP humano recombinante y el NT-proBNP humano recombinante se obtuvieron usando la combinación del anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad contra secuencia de péptidos de aminoácidos 26-51 de proBNP como captura con el clon MAb designado 6G11 como detector. Refiriéndose ahora a la Figura 5, se expone el procedimiento para llevar a cabo el ensayo ELISA de la presente invención.

El análisis posterior de los datos derivados de las muestras de plasma humano examinadas de acuerdo con estos procedimientos demostraron la utilidad de esta combinación de anticuerpos para obtener una sensibilidad y especificidad excelente al medir los niveles de NT-proBNP en individuos aparentemente sanos vs. pacientes con insuficiencia cardíaca.

De acuerdo con esta invención, se proporciona un estuche de prueba de ELISA para el propósito de llevar a cabo el procedimiento que se describió anteriormente.

5 Reactivos suministrados:

Tiras de Microtitulación Recubiertas con Proteína Anti-NT-proBNP

10 Un portatiras que contiene 96 pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo policlonal de cabra anti-NT-proBNP. Almacenar a 2-8 °C, en la bolsa con desecante, hasta la caducidad.

Estándares de la proteína NT-proBNP

15 Se proporcionan seis viales, cada uno que contienen los siguientes estándares: 0, 50, 150, 375, 1500, y 3000 pg/ml de NT-proBNP. Cada vial contiene 0.5ml, excepto para el estándar 0 pg/ml que contiene 1.0 ml. El volumen adicional permite diluir las muestras que tienen valores superiores a 3000 pg/ml, si se desea re-examinar. Almacenar a -70±10 °C. Mantener a esta temperatura, los estándares son estables durante al menos 3 ciclos de congelación/descongelación y hasta 6 meses.

20 Controles de la proteína NT-proBNP

Dos viales, de 0.5 ml cada uno, que contienen controles NT-proBNP a una concentración de proteínas baja y alta. Almacenar a -70±10 °C. Mantener a esta temperatura, los controles son estables durante al menos 3 ciclos de congelación/descongelación y hasta 6 meses.

25 Tampón de incubación

Un vial que contiene 10 ml de tampón de incubación. Almacenar a 2-8 °C hasta su expiración.

30 Anticuerpo Detector

Un vial que contiene 10 ml de anticuerpo monoclonal anti-NT-proBNP. Almacenar a 2-8 °C hasta su expiración.

Conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP)

35 Un vial que contiene 10 ml de inmunoglobulinas de burro anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante. Almacenar a 2-8 °C hasta su expiración.

Solución cromógeno

40 Un vial que contiene 10 ml de solución sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB). Almacenar a 2-8 °C hasta su expiración.

Concentrado para el lavado

45 Un frasco que contiene 60 ml de solución salina regulada con fosfato con un detergente no iónico. Diluir el contenido 25 veces con agua desionizada antes de usar. Almacenar a 2-8 °C.

Solución de Parada

50 Un frasco que contiene 10 ml de 1N de ácido sulfúrico. Almacenar a 2-8 °C.

Procedimiento del ensayo

55 Al llevar a cabo el ensayo, el tiempo entre la adición de las muestras, los estándares y los controles en el primer pocillo y el último pocillo, no debe exceder los 10 minutos. Para grandes series de muestras, ejecute el ELISA en pequeños grupos para acomodarse a este marco de tiempo.

Marcar los pocillos de la microplaca que se usan.

Añadir 50 µl de tampón de incubación a cada pocillo usando una pipeta semi-automática.

60 Añadir 50 µl de cada muestra de prueba, estándar NT-proBNP, o control NT-proBNP al micropocillo adecuado usando una micropipeta de precisión. Para garantizar la consistencia de la curva estándar, se recomienda el siguiente orden de adición a la placa:

Muestras de prueba

65 Estándares NT-proBNP

Controles NT-proBNP

- Se recomienda que los estándares y los controles de NT-proBNP se ensayen por duplicado.
- 5 Cubrir los micropocillos usando una cubierta adhesiva de placa e incubar durante 2 horas en un agitador orbital de microplacas a temperatura ambiente.
- 10 Aspirar y lavar tres veces cada micropocillo con la solución de lavado usando un lavador de microplacas adecuado. Secar invirtiendo la placa sobre material absorbente.
- 15 Ya que el lavado incompleto afecta negativamente a la precisión del ensayo, es muy recomendable el uso de un lavador de microplacas automático. Alternativamente, si un lavador de microplacas automático no está disponible, el lavado puede llevarse a cabo manualmente por aspiración repetidamente del contenido de los pocillos y rellenando cada pocillo con 340 µL de la solución de lavado, tres veces.
- Añadir 100 µl de solución de anticuerpo detector a cada pocillo usando una pipeta semi-automática
- 20 Incubar los pocillos durante 1 hora en un agitador orbital de microplacas a temperatura ambiente.
- 25 Aspirar y lavar tres veces los micropocillos con la solución de lavado usando un lavador adecuado de microplacas . Secar invirtiendo la placa sobre material absorbente.
- Añadir 100 µl de solución de conjugado HPR a cada pocillo usando una pipeta semi- automática.
- 30 Cubrir los micropocillos usando una cubierta adhesiva de placa e incubar durante 30 minutos en un agitador orbital de microplacas a temperatura ambiente.
- 35 Aspirar y lavar tres veces los micropocillos con solución de lavado. Secar invirtiendo la placa sobre material absorbente.
- Añadir 100 µl de solución TMB a cada pocillo usando una pipeta semi-automática.
- Incubar en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Evitar la exposición directa a la luz solar.
- 40 Añadir 100 µl de solución de parada (1N de ácido sulfúrico) a cada pocillo usando una pipeta semi-automática.
- Medir la absorbancia de la solución en los pocillos usando un lector de microplacas a 450 nm.
- Cálculo de los resultados:
- 45 Calcular la media de la absorbancia para cada pocillo que contiene el estándar, el control o el plasma del sujeto de prueba.
- Representar la lectura de la media de la absorbancia de cada uno de los estándares a lo largo del eje y (cuadrática) vs. la concentración de NT-proBNP, en pg/ml, a lo largo del eje x (lineal).
- 50 Trazar la mejor curva estándar apropiada a través de la media de los puntos duplicados.
- Determinar las concentraciones de NT-proBNP de plasma de los sujetos de prueba y los controles mediante la interpolación a partir de la curva estándar.
- Las lecturas de las muestras de plasma del sujeto menor que el nivel más bajo del estándar deben ser reportadas como tal.
- 55 Alternativamente, un programa de computador se puede usar para la manipulación de datos de tipo ELISA para evaluar las concentraciones de NT-proBNP en los plasmas de los sujetos de prueba y los controles. Los siguientes datos representan un ejemplo de curva de dosis respuesta usando este ensayo:

Dosis de estándar (pg/ml)	DO 450nm media
0	0.04
50	0.095
150	0.178
375	0.347

Dosis de estándar (pg/ml)	DO 450nm media
1500	1.161
3000	1.781

Nota: Estos valores no se deben usar en lugar de una curva estándar, que se debe preparar en el momento del ensayo.

5 Características del rendimiento:

Para asegurar estándares de control de calidad, dos controles denominados - bajo y alto - se proporcionan en el estuche y se deben analizar en cada ensayo. Se recomienda que cada laboratorio use controles adicionales para la validación de cada ensayo a ejecutar.

10

Sumario de los datos clínicos de NT-proBNP para el ensayo de ELISA policlonal de cabra- monoclonal 6G11.

15

Los datos están disponibles de 209 sujetos diagnosticados con insuficiencia cardíaca congestiva (NYHA Clase III y Clase IV) y 101 sujetos controles sanos normales. La curva característica operativa del receptor (ROC) se muestra en la Figura 2; se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0.974, con un error estándar correspondiente (s.e.) de 0.008. La Figura 3 muestra los diagramas de caja de los niveles de NT-proBNP en los sujetos controles y en los sujetos con insuficiencia cardíaca; a un nivel de corte de 165 pg/mL, la sensibilidad diagnóstica con respecto a los sujetos con insuficiencia cardíaca fue de 90.4% (con 189 de 209 tales sujetos con niveles de NT-proBNP por encima del valor de corte) y la especificidad diagnóstica con respecto a los sujetos controles fue 94.1% (con 95 de 101 tales sujetos con niveles de NT-proBNP más abajo del valor de corte).

20

Comparación con otros ensayos de NT-proBNP y BNP:

25

En el inserto de producto de la prueba Biosite Triage BNP (*Triage® Prueba del Péptido Natriurético Tipo B (BNP)*, inserto del Producto, Biosite Diagnostics, Inc., 2001), un análisis de la curva ROC en los datos clínicos obtenidos a partir de 804 sujetos con insuficiencia cardíaca y 1286 sujetos controles revelaron una AUC de 0.955 (error estándar = 0.0053). Al comparar este AUC con el del ensayo de NT-proBNP descrito al instante, siguiendo el procedimiento de Hanley y McNeil (Hanley JA y McNeil BJ (1982). "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve." *Radiología* 143 29-36), uno de los hallazgos es que el ensayo de NT-proBNP descrito al instante, tiene un AUC significativamente mayor ($P < 0.001$), indicativo del rendimiento de diagnóstico superior.

30

Fischer y otros., . (Fischer Y, Filzmaier K, Stiegler H, Graf J, Fuhs S, Franke A, Janasens U y Gressner AM (2001). "Evaluation of a New, Rapid Bedside Test for Quantitative Determination of B-Type Natriuretic Peptide." *Clinical Chemistry* 47 591-594.) administraron los datos de rendimiento que comparan la prueba de Triage BNP con un ensayo de EIA NT-proBNP de Roche Diagnostics con respecto a 93 sujetos con enfermedad cardíaca subyacente y la sospecha de insuficiencia cardíaca. Al distinguir los sujetos con deterioro de la función ventricular de aquellos con función ventricular preservada, se obtuvo una AUC de 0.91 (± 0.033 s.e.) para la prueba Triage BNP, y se obtuvo una AUC de 0.86 (± 0.040 s.e.) para el ensayo de Roche NT-proBNP. Teniendo en cuenta una correlación reportada entre las dos mediciones de neurohormonas $r = 0.947$, y siguiendo el método de Hanley y McNeil (Hanley JA y McNeil BJ (1983), "A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curves derived from the same cases." *Radiología* 148 839-843) para comparar AUC de derivados del mismo conjunto de casos, uno de los hallazgos es que la prueba Triage BNP tiene una AUC significativamente mayor que la del ensayo de NT-proBNP de Roche ($p = 0.005$).

35

40

Hammerer-Lercher y otros. (Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Müller S, Pachinger O, Puschendorf B y Mair J (2001). "Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction." *Acta de Química Clínica* 310 193-197) compararon el ensayo de IMRA BNP de Shionogi con el ensayo de EIA NT-proBNP de Biomédica con respecto a la misma población de 57 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable. Al distinguir los sujetos con deterioro de la función ventricular de aquellos con función ventricular preservada, se obtuvo una AUC de 0.75 (± 0.06 s.e.) para el ensayo de BNP, y se obtuvo una AUC de 0.67 (± 0.07 s.e.) para el ensayo de NT-proBNP de Biomédica. Siguiendo el método de Hanley y McNeil (Hanley JA y McNeil BJ (1983). "A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curves derived from the same cases." *Radiología* 148 839-843), uno de los hallazgos es que el ensayo de BNP de Shionogi tiene una AUC significativamente mayor que la del ensayo de NT-proBNP Biomédica ($p = 0.009$).

45

50

Luchner y otros.,. (Luchner A, Hengstenberg C, Löwel H, Trawinski J, Baumann M, Riegger G, Schunkert H y Holmer S (2002). "N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide After Myocardial Infarction." *Hypertension* 39 99-104) llevaron a cabo un amplio estudio clínico que incluyó a 594 sujetos con infarto del miocardio y 449 controles sanos, para determinar la capacidad del ensayo EIA NT-proBNP de Roche para predecir la disminución de la función ventricular en estos sujetos. Los autores citan un AUC de 0.77 (± 0.057 s.e.) con respecto a NT-proBNP al separar los sujetos con una fracción de eyección ventricular izquierda menor de 35% de los que tienen una fracción de eyección mayor. Este AUC es significativamente menor que el citado anteriormente para el ensayo de NT-proBNP descrito al instante ($p=0.000$).

55

60

Así, sobre la base de cuantificar los ensayos de diversas maneras disponibles para determinar la presencia de NT-proBNP en base a un análisis del área bajo la curva, se espera que el presente ensayo pueda exhibir un rendimiento de diagnóstico superior.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta especificación son indicativas de los niveles de aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece la invención.

Es de entenderse que mientras que una cierta forma de la invención se ilustra, no ha de limitarse a la forma específica o al arreglo descrito en la presente invención y se muestra. Una persona con experiencia en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención se adapta bien para portar los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos inherentes en la misma. Las modalidades, los métodos, los procedimientos y las técnicas descritos en la presente invención son actualmente representativos de las modalidades preferidas, están destinadas a ser ilustrativas y no se pretenden como limitaciones en el alcance. Aunque la invención se describió en conexión con modalidades específicas preferidas, se debe entender que la invención como se reivindica no se debe limitar indebidamente a tales modalidades específicas.

La siguiente sección de la descripción consiste en párrafos numerados simplemente para proporcionar declaraciones de la invención ya descritos en la presente invención. Los párrafos numerados en esta sección no son reivindicaciones. Las reivindicaciones se exponen más abajo en la sección posterior titulada "reivindicaciones".

1. Un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) proceso útil en el diagnóstico, estratificación, y predicción de la tasa de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva que comprende:
obtener anticuerpos policlonales específicos aislados para una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1, los aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident.: 1, y los aminoácidos 52-76 de la sec. con núm. de ident.: 1;
seleccionar un anticuerpo policlonal a partir de dicho grupo y unir dicho anticuerpo policlonal a un soporte sólido; hacer reaccionar una muestra clínica sospechosa de contener fragmentos inmunogénicos de NT-proBNP con dicho anticuerpo policlonal aislado;
proporcionar un anticuerpo monoclonal detector seleccionado como reconocedor de una secuencia de aminoácidos que está separada y distinta de la secuencia de aminoácidos reconocida por el anticuerpo policlonal;
efectuar una inmunorreacción; y
detectar dicha inmunorreacción.

2. EL ensayo de 1 en donde:
dicho anticuerpo policlonal se selecciona como específico para una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 26 a 51 de la sec. con núm. de ident.: 1.

3. EL ensayo de 1 en donde:
dicho anticuerpo policlonal se selecciona como específico para una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 52-76 de la sec. con núm. de ident.: 1.

4. EL ensayo de 1 en donde:
dicho anticuerpo policlonal se produce a partir de la línea celular de hibridomas 6G11-F11-D12, que corresponde a la ATCC # PTA-4844 y es específica para un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1.

5. EL ensayo de 1 en donde:
dicho anticuerpo policlonal se produce a partir de la línea celular de hibridomas 1C3-E11-H9, que corresponde a la ATCC # PTA-4845 y es específica para un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1.

6. El ensayo de 1 en donde dicha detección es directa

7. El ensayo de 1 en donde dicha detección es indirecta.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syn X Pharma, Inc.

<120> Ensayo de ELISA Policlonal-Monoclonal para detectar N-Terminal del proBNP

<130> 2132PCT.137

<150> US 10/300,733

<151> 2002-11-18

<150> US 10/359,051

<151> 2003-02-04

<160> 1

<170> Versión de patente 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
65 70 75 80

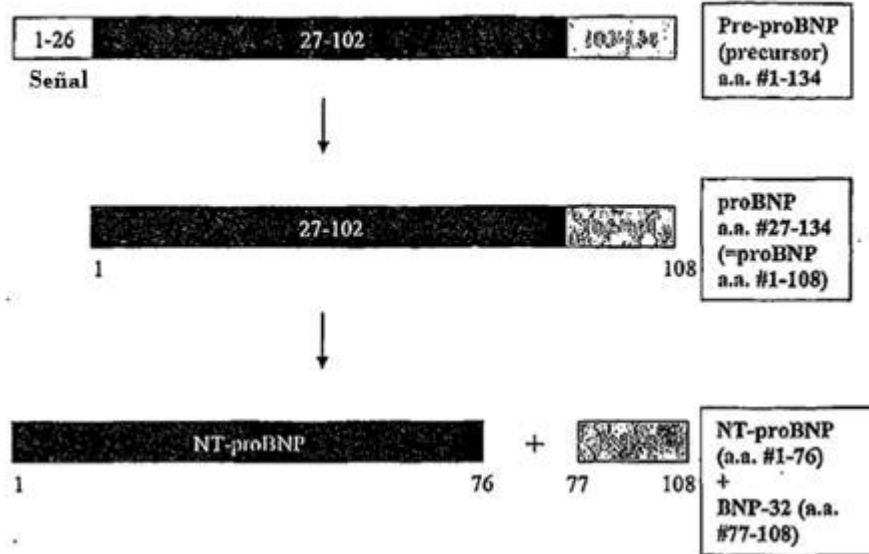
Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
100 105

Reivindicaciones

1. Un estuche de prueba para determinar un nivel de N-terminal del pro-péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) en una muestra, que comprende:
anticuerpos policlonales aislados específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 26-51 de la sec. con
núm. de ident.:1, y
anticuerpos monoclonales aislados específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 1-25 de la sec. con
núm. de ident.:1, en donde los anticuerpos monoclonales se unen a un soporte sólido,
en donde los anticuerpos policlonales y monoclonales forman un inmunocomplejo detectable con NT-proBNP en una
muestra.
2. Un estuche como se reivindica en la reivindicación 1, en donde se biotinilan los anticuerpos monoclonales.
3. Un estuche como se reivindica en la reivindicación 1, en donde se biotinilan los anticuerpos policlonales.
4. Un estuche como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el inmunocomplejo se detecta directamente.
5. Un estuche como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el inmunocomplejo se detecta indirectamente.
6. Un estuche como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en donde los anticuerpos monoclonales se unen a una región de NT-proBNP reconocida por el anticuerpo monoclonal producido por una línea celular de hibridoma designada como 6G11-F11-D12 y depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipos (ATCC) como Número de Acceso PTA-4844.
7. Un método para determinar un nivel de N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) en una muestra, el método que comprende:
contactar una muestra con anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, siendo los anticuerpos policlonales
específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident.:1,
y los anticuerpos monoclonales aislados siendo específicos para NT-proBNP en los residuos de aminoácidos 1-25 de la
sec. con núm. de ident.:1, en donde los anticuerpos monoclonales se unen a un soporte sólido, y
cuantificar la cantidad de un inmunocomplejo formado por los anticuerpos policlonales y monoclonales con NT-proBNP
en la muestra.
8. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, en donde se biotinilan los anticuerpos monoclonales.
9. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, en donde se biotinilan los anticuerpos policlonales.
10. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el inmunocomplejo se detecta directamente.
11. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el inmunocomplejo se detecta indirectamente.
12. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones de la 7 a la 11, en donde los anticuerpos monoclonales se unen a la región de NT-proBNP reconocida por el anticuerpo monoclonal producido por una línea celular de hibridoma designada como 6G11-F11-D12 y depositada en la Colección Americana de Cultivos tipos (ATCC) como Número de Acceso PTA-4844.
13. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones de la 7 a la 12, en donde la muestra es sangre, suero, plasma, u orina; preferentemente en donde la muestra es plasma.

FIGURA 1



Péptidos de aminoácidos de pro BNP sintetizada(usados para la purificación por afinidad de PAb de cabra)



Péptido 1 =proBPN a.a #1-25
 Péptido 2 =proBPN a.a #26-51
 Péptido 3 =proBPN a.a #52-76

Nota: El anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad contra el péptido 2 de aminoácidos (a.a 26-51) se seleccionó para el uso como captura. El anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad contra el péptido 1 de aminoácidos (a.a 1-25) se seleccionó para el uso como detector. El anticuerpo policlonal de cabra se purificó además por afinidad contra el péptido 3 de aminoácidos (a.a 52-76), sin embargo este material no se seleccionó para el uso en el formato final de ELISA de NT-proBNP.

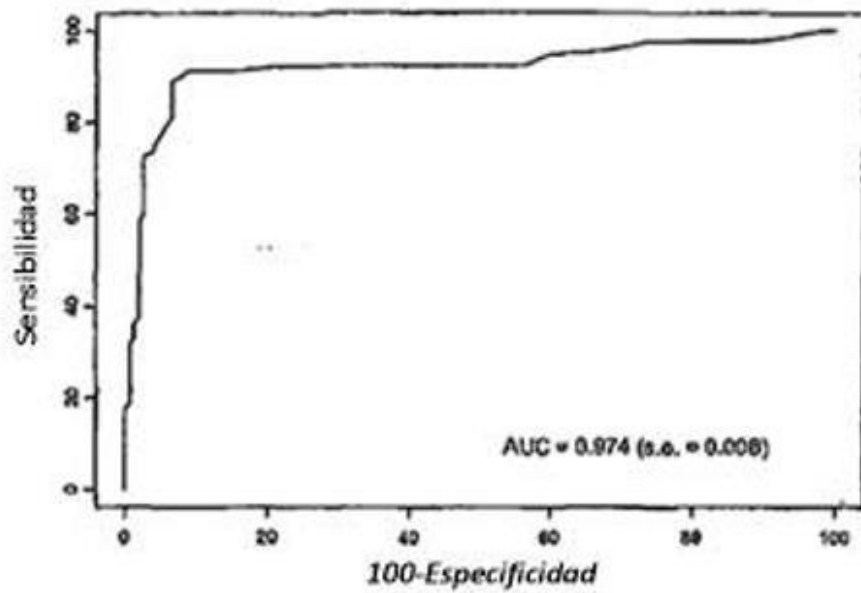


Figura 2 : Curva ROC para NT-proBNP (ensayo carnero –G11)

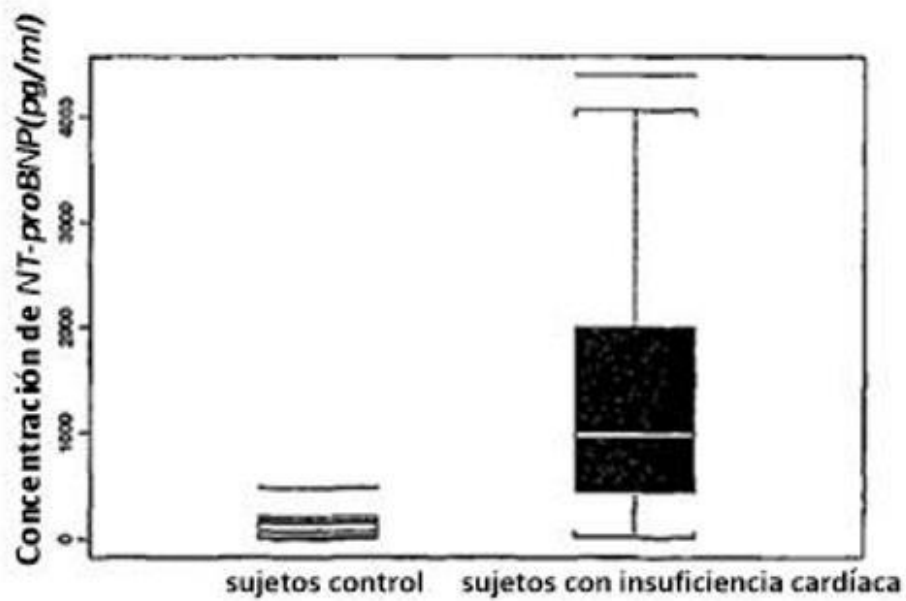


Figura 3: Niveles de NT-proBNP (ensayo carnero –G11) en los sujetos control y en sujetos con insuficiencia cardíaca (NYHA Clase III y IV)

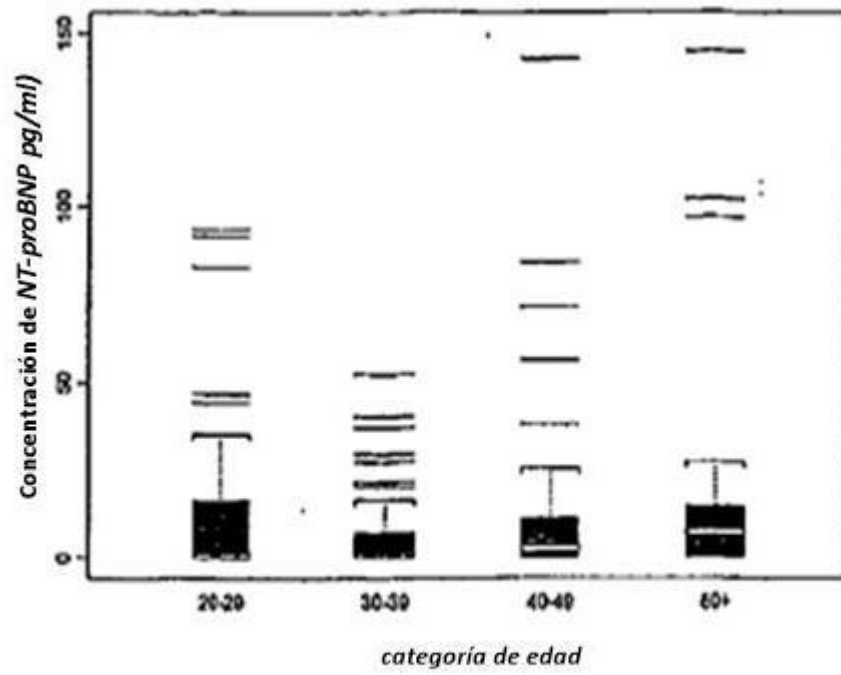


Figura 4: Niveles de NT-proBNP en los sujetos control estratificados por categoría de edad.

FIGURA 5

Procedimiento de ELISA de NT-proBNP (Formato de ensayo cabra/G11)

