

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 635**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**C07K 16/26** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2008 PCT/FI2008/050184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2008 WO08125733**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2008 E 08736833 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2135087**

54 Título: **Inmunoanálisis para la cuantificación de un antígeno inestable seleccionado de BNP y proBNP**

30 Prioridad:

**13.04.2007 FI 20075251**  
**13.04.2007 US 911603 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.02.2017**

73 Titular/es:

**HYTEST LTD. (100.0%)**  
**Joukahaisenkatu 6**  
**20520 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**TAMM, NATALIA, N.;**  
**KATRUKHA, ALEXEY, G.;**  
**FILATOV, VLADIMIR, L. y**  
**KOLOSOVA, OLGA, V.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 599 635 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**

Inmunoanálisis para la cuantificación de un antígeno inestable seleccionado de BNP y proBNP

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a inmunoanálisis, y proporciona un método de inmunoanálisis para la detección de antígenos inestables. El método es especialmente adecuado para la detección de BNP, proBNP y uno de sus fragmentos.

**Antecedentes de la invención**

- 10 BNP y proBNP son marcadores fiables de la insuficiencia cardíaca (IC), ampliamente utilizado en la práctica clínica. Varios tipos de inmunoanálisis de tipo sándwich (análisis convencionales) que utilizan dos anticuerpos monoclonales o policlonales, específicos para diferentes epítomos de BNP o fragmentos de BNP de la molécula de proBNP se describen en la bibliografía.

- 15 La molécula de BNP es conocida como una molécula sumamente inestable que pierde rápidamente su actividad inmunológica en soluciones acuosas. Esta pérdida de actividad está relacionada generalmente con la degradación proteolítica del péptido. Los inmunoanálisis de tipo sándwich frecuentemente utilizado para inmunodetección cualitativa o cuantitativa de antígenos utilizan dos o más anticuerpos específicos para dos o más epítomos diferentes. Cuanto mayor es la distancia entre los epítomos, mayor es la probabilidad de que los puntos de proteólisis estén situados entre los epítomos de los anticuerpos, aumentando así la sensibilidad del ensayo a la degradación proteolítica del antígeno. Y viceversa, cuanto más próximos estén los epítomos entre sí, menor es la probabilidad de la escisión proteolítica de la molécula entre los epítomos.

- 20 Se han descrito métodos de inmunoanálisis para moléculas muy pequeñas, incluida la aplicación de los llamados anticuerpos antimetatipo. Dichos métodos están descritos, p. ej., para la detección de digoxina (Self *et al.*, 1994, *Clin. Chem.* 40:2035-2041) y angiotensina II (Towbin *et al.*, 1995, *J. Immunol. Meth.* 181:167-176 ).

Sin embargo, no es una tarea fácil aplicar este tipo de método a diferentes analitos, ya que se requieren anticuerpos monoclonales muy específicos en dicho método.

- 25 En técnicas relacionadas existen varias publicaciones científicas y también de patente que describen anticuerpos NT-proBNP, proBNP y BNP e inmunoanálisis.

Karl *et al.* (*Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1999, vol. 59, supl. 230, págs. 177-181) describen un inmunoanálisis muy sensible y específico que utiliza dos anticuerpos, el primero que es específico para el péptido 1-21 NT-proBNP y el segundo específico para el péptido 30-38 NT-proBNP.

- 30 Teramura *et al.*, (*Anal. Biochem.*, 2006, vol. 357, págs. 208-215) describen la detección de BNP utilizando un inmunoanálisis de tipo sándwich y utilizando un anticuerpo monoclonal primario y secundario, reconociendo los aminoácidos 30-32 y 14-21 de BNP.

Ala-Kopsala *et al.* (*Clin. Chem.*, 2004, vol. 50, págs. 1576-1588) describen quince péptidos sintéticos, que abarcan la secuencia de NT-proBNP, y se utiliza como epítomos para producir anticuerpos.

- 35 Matsuura *et al.* (*Anal. Chem.*, 2005, vol. 77, págs. 4235-4240) describen un enzimoanálisis para la determinación de BNP, utilizando anticuerpos dirigidos a toda la secuencia de BNP.

Collinson *et al.*, (*European J. of Heart Failure*, 2004, vol. 6, págs. 365-368) describe un método de inmunoanálisis para la determinación de NT-proBNP usando anticuerpos policlonales dirigidos contra los restos 1-21 y 39-50 del NT-proBNP.

- 40 Shimizu *et al.*, (*Clin. Chim. Acta*, 2003, vol. 334, págs. 233-239) investigan por radioinmunoanálisis las formas de proBNP en sangre, utilizando anticuerpos contra cuatro péptidos proBNP sintéticos.

El documento WO 2006/088700 describe anticuerpos BNP anular, específicos humanos e inmunoanálisis que utilizan dichos anticuerpos.

- 45 La patente EP 1 016 867 describe un inmunoanálisis para la determinación de BNP, utilizando anticuerpos, que se dirigen al fragmento del terminal C y al del terminal N de BNP, así como la estructura anular de BNP.

Los documentos WO 2007/056507 y WO 2007/138163 se publicaron después de la fecha de prioridad de la presente solicitud. Ambos describen anticuerpos que son específicos para la secuencia del terminal N de BNP.

**Descripción de la invención**

En la presente memoria los autores están describiendo un inmunoanálisis para la cuantificación de BNP y proBNP en la sangre humana. Los autores han denominado el ensayo "sándwich desigual". Este ensayo es aplicable a la inmunodetección de todos los antígenos inestables.

5 El inmunoanálisis descrito en la presente solicitud utiliza dos anticuerpos monoclonales diferentes. En la detección de BNP o proBNP el primer anticuerpo monoclonal (MAb 24C5) es específico de la región (o una parte de esta región) que comprende los restos de aminoácidos 11-22 (<sup>11</sup>FGRKMDRIS<sub>SSS</sub><sub>22</sub>) de BNP (que corresponden a los restos de aminoácidos 87 a 98 de proBNP) (Fig. 1). El segundo anticuerpo (es decir, los MAb Ab-BNP2 y Ab-BNP4), o uno de sus fragmentos, marcado con un componente que produce la señal, reconoce un inmunocomplejo del primer anticuerpo con el antígeno (BNP, proBNP o uno de sus fragmentos que comprende los restos de aminoácidos <sup>11</sup>FGRKMDRIS<sub>SSS</sub><sub>22</sub> o una parte de esta secuencia que comprende al menos tres restos de aminoácidos de dicha secuencia). El segundo anticuerpo no reconoce (o reconoce con muy baja afinidad 10 veces o menos) el antígeno libre o sus fragmentos, o MAb 24C5 libre. Por lo tanto el inmunocomplejo primario que comprende MAb 24C5 y BNP (o proBNP, o uno de sus fragmentos) sirve como un antígeno para el segundo anticuerpo (los Ab-MAb BNP2 y Ab-BNP4).

Por consiguiente, el objeto general de la presente invención es un método de inmunoanálisis para la detección de un antígeno inestable en una muestra, que comprende

- (a) poner en contacto un antígeno de interés con un primer anticuerpo específico para un primer epítipo de la molécula de antígeno, para obtener un inmunocomplejo de primera orden,
- 20 (b) poner en contacto el inmunocomplejo de primer orden obtenido en la etapa (a) con un segundo anticuerpo, que reconoce dicho inmunocomplejo de primer orden y es específico para un segundo epítipo formado por el antígeno de interés y el primer anticuerpo, para obtener un inmunocomplejo de segundo orden, en donde dicho segundo anticuerpo es incapaz de reconocer al antígeno libre o uno de sus fragmentos o al primer anticuerpo libre, o los reconoce con afinidad significativamente menor - 10 veces o menos - que reconocen al inmunocomplejo de primer orden, y
- 25 (c) detectar la formación de inmunocomplejos de segundo orden.

Un objeto específico de la invención es un método de inmunoanálisis para detectar un antígeno seleccionado del grupo que consiste en BNP, proBNP y uno de sus fragmentos en una muestra, que comprende

- 30 (a) poner en contacto el antígeno con un primer anticuerpo específico para el fragmento <sup>11</sup>FGRKMDRIS<sub>SSS</sub><sub>22</sub> de la molécula BNP o para una parte de este péptido que comprende al menos tres restos de aminoácidos de dicha secuencia, para obtener un inmunocomplejo de primer orden,
- (b) poner en contacto el inmunocomplejo de primer orden obtenido en la etapa (a) con un segundo anticuerpo que reconoce dicho inmunocomplejo de primer orden, para obtener un inmunocomplejo de segundo orden, en donde dicho segundo anticuerpo es incapaz de reconocer BNP libre, proBNP o uno de sus fragmentos o al primer anticuerpo libre, o los reconoce con afinidad significativamente menor - 10 veces o menos - que lo reconoce el inmunocomplejo de primer orden, y
- 35 (c) detectar la formación de inmunocomplejos de segundo orden.

Los autores han logrado producir anticuerpos monoclonales específicos aplicables en el procedimiento de la invención. Estos anticuerpos son objetos específicos de la presente invención.

40 El sándwich desigual descrito en la presente memoria demuestra extraordinaria insensibilidad a la degradación proteolítica del antígeno en comparación con los ensayos que utilizan anticuerpos específicos para epítopos situados a distancia.

También dicha estrategia podría ser útil en los casos donde se desarrolla el ensayo para la inmunodetección del antígeno que es similar a uno u otros antígenos más; tiene numerosos epítopos diferentes en su superficie, pero tiene sólo uno (o más, pero en número muy limitado) de epítopos únicos, que distingue a ese antígeno concreto de todos los demás.

**Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1. Estructuras de BNP y proBNP y especificidad de epítipo del MAb 24C5.

50 MAb 24C5 reconoce fragmentos de la molécula BNP que comprende los restos de aminoácidos 11-22 y fragmentos de proBNP que consiste en restos de aminoácidos 87-98 (marcados en oscuro).

Fig. 2A, 2 B y 2 C. Los anticuerpos Ab-BNP2 y Ab-BNP4 no reconocen a BNP ni a proBNP que no forman complejos con MAb 24C5.

Los MAb marcados con Eu 24C5, Ab-BNP2, Ab-BNP4 (200 ng/pocillo) se incubaron en placas recubiertas con:

- A. 50 ng/pocillo de BNP
- B. 100 ng/pocillo de proBNP
- C. anticuerpos policlonales anti-BNP (2 mg/pocillo) preincubados con BNP (0,5 ng/pocillo)

5 Fig. 3. Los anticuerpos Ab-BNP2 y Ab-BNP4 pueden reconocer a inmunocomplejos de BNP (o péptido 11-22) con MAb 24C5

Protocolo de ensayo en tres etapas:

Primera etapa: las placas se recubrieron previamente con MAb 24C5 de captura

Segunda etapa: Después de lavar las placas se incubaron con antígenos (BNP o péptido 11-22);

10 Tercera etapa: Después de lavar las placas se incubaron con anticuerpos (Ab-BNP2, Ab-BNP4 o 57H3) de detección (marcados con Eu<sup>3+</sup>).

Después del lavado se añadió solución de mejora y se midió la señal.

Fig. 4. Los anticuerpos Ab-BNP2 y Ab-BNP4 pueden reconocer a proBNP, que forma inmunocomplejos con MAb 24C5

15 Protocolo de ensayo en tres etapas:

Primer etapa: Las placas se recubrieron previamente con MAb 24C5 de captura

Segunda etapa: Después de lavar las placas se incubaron con proBNP (5 ng/ml)

Tercera etapa: Después de lavar las placas se incubaron con anticuerpos de detección (Ab-BNP2, Ab-BNP4 o 57H3).

20 Después del lavado se añadió solución de mejora y se midió la señal.

Fig. 5. Estabilidad de BNP en plasma humano normal.

Se añadió BNP sintético a una mezcla de plasma humano normal (2 ng/ml), se incubó a +4°C durante diferentes períodos. La actividad inmunológica se puso a prueba en tres ensayos diferentes: uno convencional y dos de tipo sándwich desiguales.

25 Fig. 6. Determinaciones de BNP/proBNP en la sangre de pacientes con IC y donantes sanos. Las muestras de plasma de 6 pacientes con insuficiencia cardíaca (IC 1 - IC 6) y las muestras de plasma de donantes sanos (NP1-NP4) se analizaron en tres ensayos. Se utilizó BNP sintético (Bachem) como calibrador en todos los ensayos.

Fig. 7A, 7 B y 7 C. Curvas de calibración para dos sándwiches desiguales (24C5 - Ab-BNP2, 24C5 - Ab-BNP4) y un ensayo convencional (50E1 - 24C5-UE). Antígeno: BNP sintético (Bachem).

### 30 Experimentación

Observaciones: estable En todos los experimentos se utilizaron como anticuerpos de detección anticuerpos marcados con quelato de Eu. Los anticuerpos monoclonales 24C5, Ab-BNP2, Ab-BNP4, 57H3 y 50E1 utilizados en los experimentos están disponibles en Hytest Ltd, Turku, Finlandia.

35 Ejemplo 1. Los anticuerpos Ab-BNP2 y Ab-BNP4 no reconocen a BNP ni a proBNP que no forman complejos con MAb 24C5 (Fig. 2 )

En el experimento presentado en la Fig. 2A y Fig. 2B se utilizaron antígenos (BNP y proBNP, respectivamente) para el recubrimiento de placas y anticuerpos marcados con Eu se ensayaron con el antígeno en inmunoanálisis directo. El anticuerpo 24C5 reconoce ambas formas de antígeno, mientras que los MAb Ab-BNP2 y Ab-BNP4 no dan ninguna respuesta (señal comparable con el fondo) con ninguno de los dos antígenos.

40 En el experimento presentado en la Fig. 2C las placas se recubrieron con anticuerpos policlonales específicos para diferentes epítomos en la molécula de BNP. En la segunda etapa, las placas se incubaron con BNP y a continuación con anticuerpos marcados con Eu. Este método ayuda a obtener orientación variable del antígeno contra la superficie de la placa, asegurando que la orientación de la molécula en la superficie de la placa no tiene influencia en los resultados experimentales. En este experimento se obtuvieron los mismos resultados que los descritos anteriormente: los MAb Ab-BNP2 y Ab-BNP4 no fueron capaces de reconocer el antígeno, que no está formando complejo con MAb 24C5.

45

Ejemplo 2. Los anticuerpos Ab-BNP2 y Ab-BNP4 puede reconocer a BNP y al péptido 11-22, que se están formando inmunocomplejo con MAb 24C5 (Fig. 3)

5 MAb 24C5 es específico para el fragmento 11 a 22 de la molécula de BNP o para la región correspondiente 87-98 de proBNP. Para demostrar que el inmunocomplejo 24C5-BNP y 24C5-péptido 11-22 podría ser reconocido por los MAb Ab-BNP2 y Ab-BNP4 se utilizó el MAb 24C5 para el revestimiento de placas, a continuación se incubaron las placas con BNP o péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 11- 22 de la secuencia de BNP (péptido 11-22). Una vez formado el inmunocomplejo entre MAb 24C5 y antígenos, las placas se incubaron con anticuerpos marcados con Eu Ab-BNP2, Ab-BNP4 y 57H3, específicos para la región 26-32 de la molécula de BNP.

10 sándwich desigual reconoce BNP y el péptido casi con la misma eficiencia. Los anticuerpos de ensayo que utilizan 24C5 (recubrimiento) -57H3-UE no reconocen (señal comparable con el fondo) péptido 11-22.

Ejemplo 3. Los anticuerpos Ab-BNP2 y Ab-proBNP BNP4 puede reconocer, que forma complejo inmunológico con MAb 24C5 (Fig. 4)

15 El sándwich desigual reconoce a proBNP y al péptido con la misma eficacia que un ensayo convencional. Los autores utilizaron MAb 24C5 para el recubrimiento de placas y a continuación incubaron las placas en primer lugar con proBNP recombinado (5 ng/ml) y en segundo lugar con anticuerpos marcados con Eu Ab-BNP2, Ab-BNP4 y 57H3 específicos para la región 26-32 de la molécula de BNP. Las señales obtenidas en los inmunoanálisis del sándwich desigual y convencionales son comparables. Los autores llegaron a la conclusión de que los nuevos ensayos se podrían utilizar para la inmunodetección cuantitativa de proBNP.

Ejemplo 4. Estabilidad aparente del antígeno (Fig. 5)

20 Se añadió BNP sintético (Bachem) a una mezcla de plasma humano normal (2 ng/ml), se incubó a +4°C durante diferentes períodos y se determinó la actividad inmunológica en tres ensayos diferentes - uno convencional y dos sándwiches desiguales.

25 La estabilidad aparente del antígeno, que se determina en sándwiches desiguales, descrita en la presente memoria es significativamente mayor en comparación con la estabilidad determinada por los ensayos de BNP convencionales que utilizan dos MAb específicos para diferentes partes de molécula de BNP. Como ejemplo de ensayo convencional se utilizó el ensayo que utiliza MAb 50E1 específico para la región 26-32 de la molécula de BNP y MAb 24C5 específico para la región 11-22 de la molécula de BNP. Se observó aproximadamente el 70% de actividad inmunológica después de 24 horas de incubación a + 4°C (69,8% y 68% para los ensayos que utilizan Ab-BNP2 y Ab-BNP4, respectivamente) en el caso en el que se utilizó sándwich desigual para determinar la inmunorreactividad y sólo el 28% en el caso del ensayo convencional. Seis días después del comienzo de la incubación no se observó inmunorreactividad en el caso de ensayos convencionales, mientras que aproximadamente ¼ de la inmunorreactividad inicial se observó en el caso de sándwiches desiguales.

30

Ejemplo 5. Determinaciones de BNP/proBNP en la sangre de pacientes con insuficiencia cardíaca (pacientes con IC) y la sangre de donantes sanos (Fig. 6)

35 Los ensayos en sándwich desigual, así como de BNP convencionales son capaces de detectar en la sangre humana ambas formas del antígeno que presentan "inmunorreactividad a BNP", es decir BNP y proBNP. Muestras de sangre de varios pacientes con IC y donantes sanos se analizaron en tres ensayos - uno convencional, utilizando MAb 50E1 de captura, específico para el fragmento 26-32 de la molécula BNP y detección de MAb 24C5-Eu y dos sándwiches desiguales. Todos los ensayos se calibraron usando BNP sintético. Como se desprende de la Fig. 6, Los resultados de la prueba en los tres ensayos son muy similares. En algunas muestras los resultados de las pruebas en el ensayo convencional son menores que en los sándwiches desiguales. Esta observación puede explicarse por el hecho de que en dichas muestras BNP se degrada parcialmente, pero por el hecho de que el antígeno presenta mejor estabilidad aparente en sándwiches desiguales, los valores de antígeno determinados por estos ensayos son mayores que en un ensayo convencional.

40

45 Ejemplo 6. Curvas de calibración (Fig. 7)

Las curvas de calibración para dos sándwiches desiguales y un ensayo convencional con BNP sintético usado como antígeno se presentan en la Fig. 7 (A, B y C). Ambos sándwiches desiguales demuestran gran sensibilidad, comparable con la sensibilidad del ensayo convencional y podrían utilizarse para la detección precisa de inmunoreactividad de BNP y proBNP en la sangre humana.

50

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Hytest Ltd.

<120> Inmunoanálisis para la cuantificación de un antígeno inestable seleccionado de BNP y proBNP

<130> 46313

5

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 108

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

# ES 2 599 635 T3

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

ES 2 599 635 T3

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser  
1 5 10



**REIVINDICACIONES**

1. Un método de inmunoanálisis para la detección de una proteína de BNP o proBNP en una muestra, que comprende

5 (a) poner en contacto la proteína con un primer anticuerpo específico para un epítipo situado en el fragmento de proteína BNP o proBNP, que tiene la secuencia de aminoácidos FGRKMDRISSSS, representada en la SEQ ID n°: 3, para obtener un inmunocomplejo de primer orden,

10 (b) poner en contacto el inmunocomplejo de primer orden obtenido en la etapa (a) con un segundo anticuerpo que reconoce dicho inmunocomplejo de primer orden, y que es específico para un epítipo situado en el inmunocomplejo de primer orden, formando el epítipo cuando el primer anticuerpo se une a la proteína BNP o proBNP o a uno de sus fragmentos que consiste en la SEC ID n°: 3, para obtener un inmunocomplejo de segundo orden, en donde dicho segundo anticuerpo es incapaz de reconocer BNP libre, proBNP libre o primer anticuerpo libre, o los reconoce con afinidad significativamente menor - 10 veces o menos - de lo que los reconoce el inmunocomplejo de primer orden, y

15 (c) detectar la formación del inmunocomplejo de segundo orden, en donde la proteína analizada ha mejorado la estabilidad aparente en comparación con la de una proteína analizada utilizando anticuerpos específicos para epítipos situados a distancia de BNP o proBNP.

20 2. Un anticuerpo monoclonal, que es específico para un epítipo situado en el inmunocomplejo de primer orden obtenido según la etapa (a) de la reivindicación 1, formando el epítipo cuando el primer anticuerpo se une a la proteína BNP o proBNP o a uno de sus fragmentos que consiste en la SEQ ID n°: 3, en donde dicho segundo anticuerpo reconoce a dicho inmunocomplejo de primer orden, pero es incapaz de reconocer a BNP libre, proBNP libre o al primer anticuerpo libre, o los reconoce con afinidad significativamente menor - 10 veces o menos - que lo reconoce el inmunocomplejo de primer orden.

3. Un equipo de inmunoanálisis para la detección de una proteína BNP o proBNP en una muestra, que comprende

25 (a) un primer anticuerpo específico para un epítipo situado en el fragmento de la proteína BNP o proBNP, que tiene la secuencia de aminoácidos FGRKMDRISSSS, representada en la SEQ ID n°: 3, siendo capaz el anticuerpo de formar un inmunocomplejo de primer orden con la proteína, y

30 (b) un segundo anticuerpo, que es específico para un epítipo situado en dicho inmunocomplejo de primer orden, formando el epítipo cuando el primer anticuerpo se une a la proteína BNP o proBNP o a uno de sus fragmentos que consiste en la SEC ID n°: 3, y es capaz de formar un inmunocomplejo de segundo orden con dicho inmunocomplejo de primer orden, en donde dicho segundo anticuerpo reconoce a dicho inmunocomplejo de primer orden, pero es incapaz de reconocer a BNP libre, proBNP libre o al primer anticuerpo libre, o los reconoce con afinidad significativamente menor - 10 veces o menos - que reconoce al inmunocomplejo de primer orden.

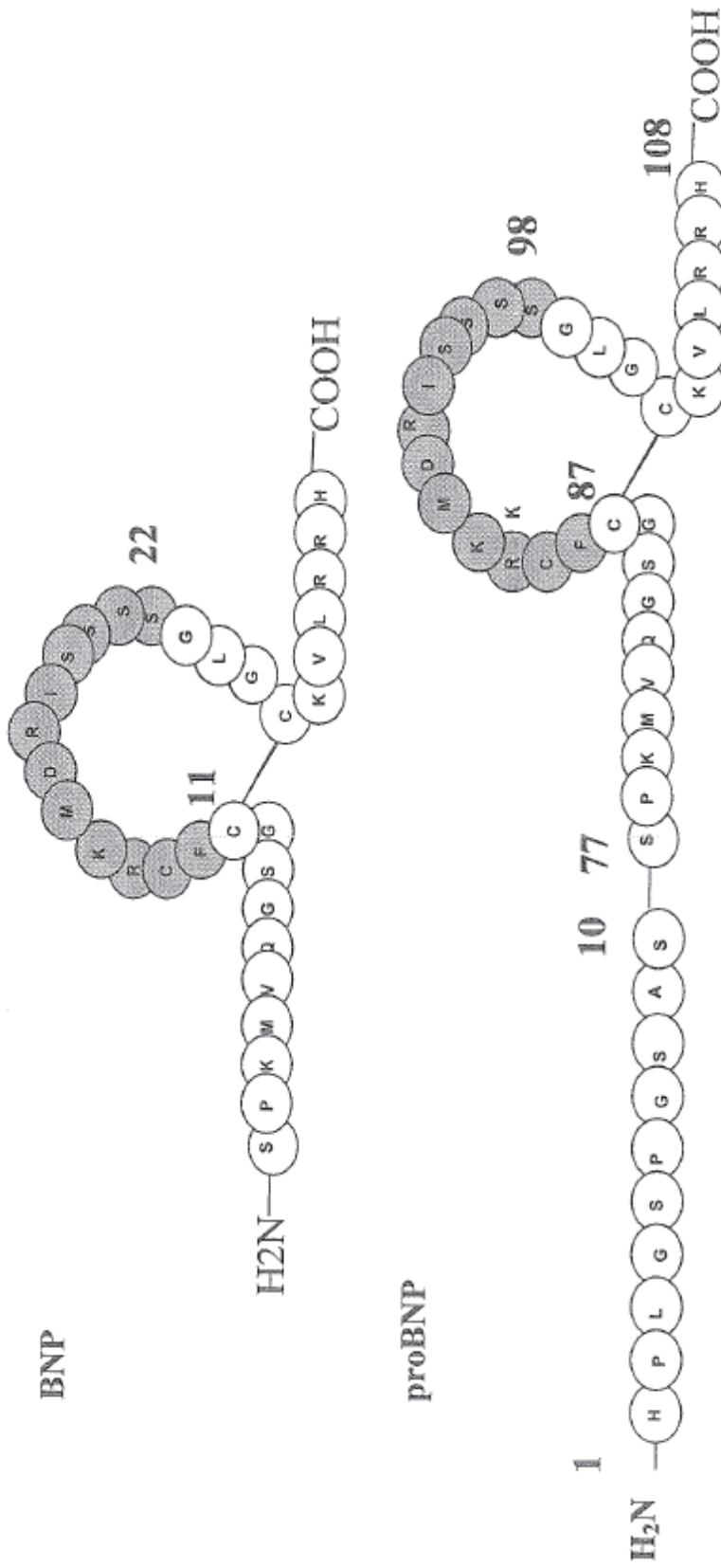
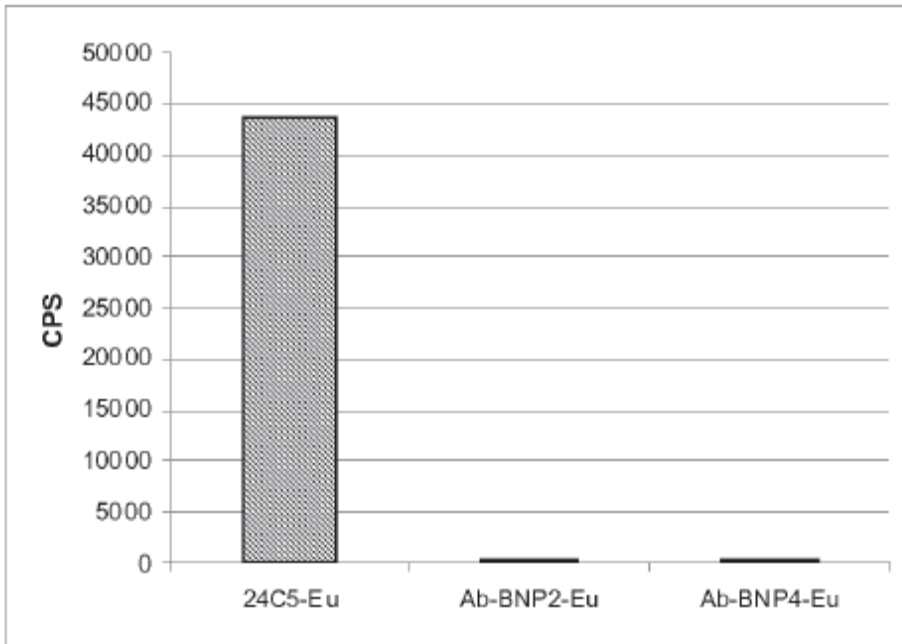
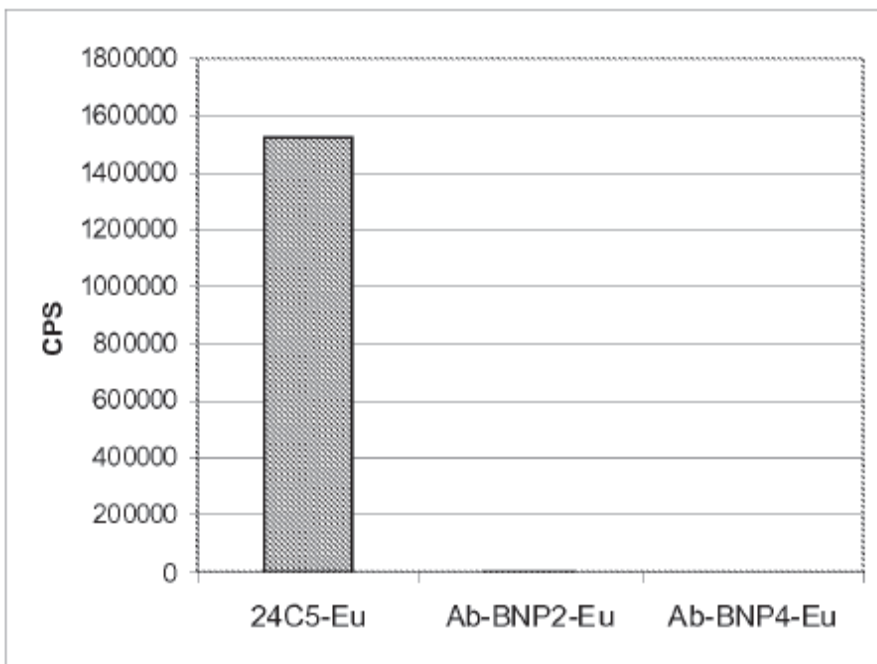


Fig. 1



**Fig. 2A**



**Fig. 2B**

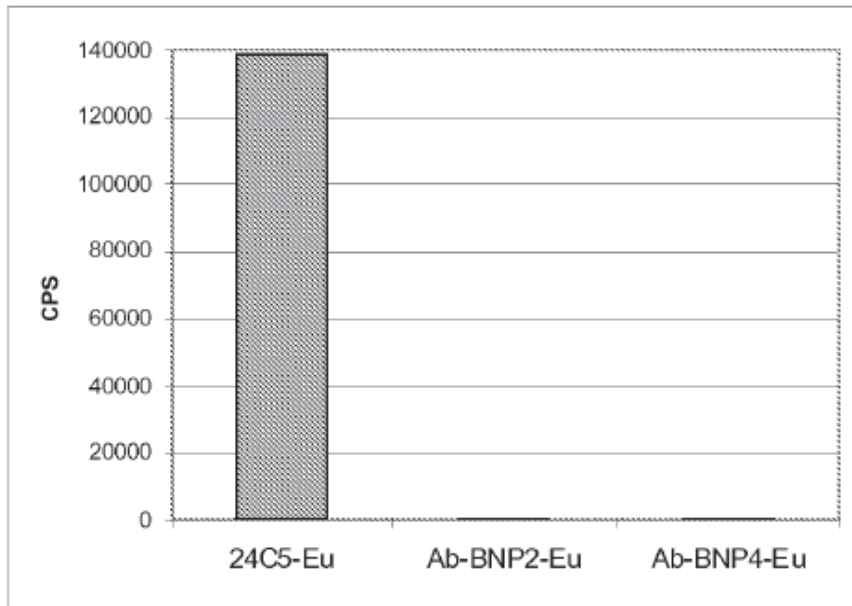


Fig. 2C

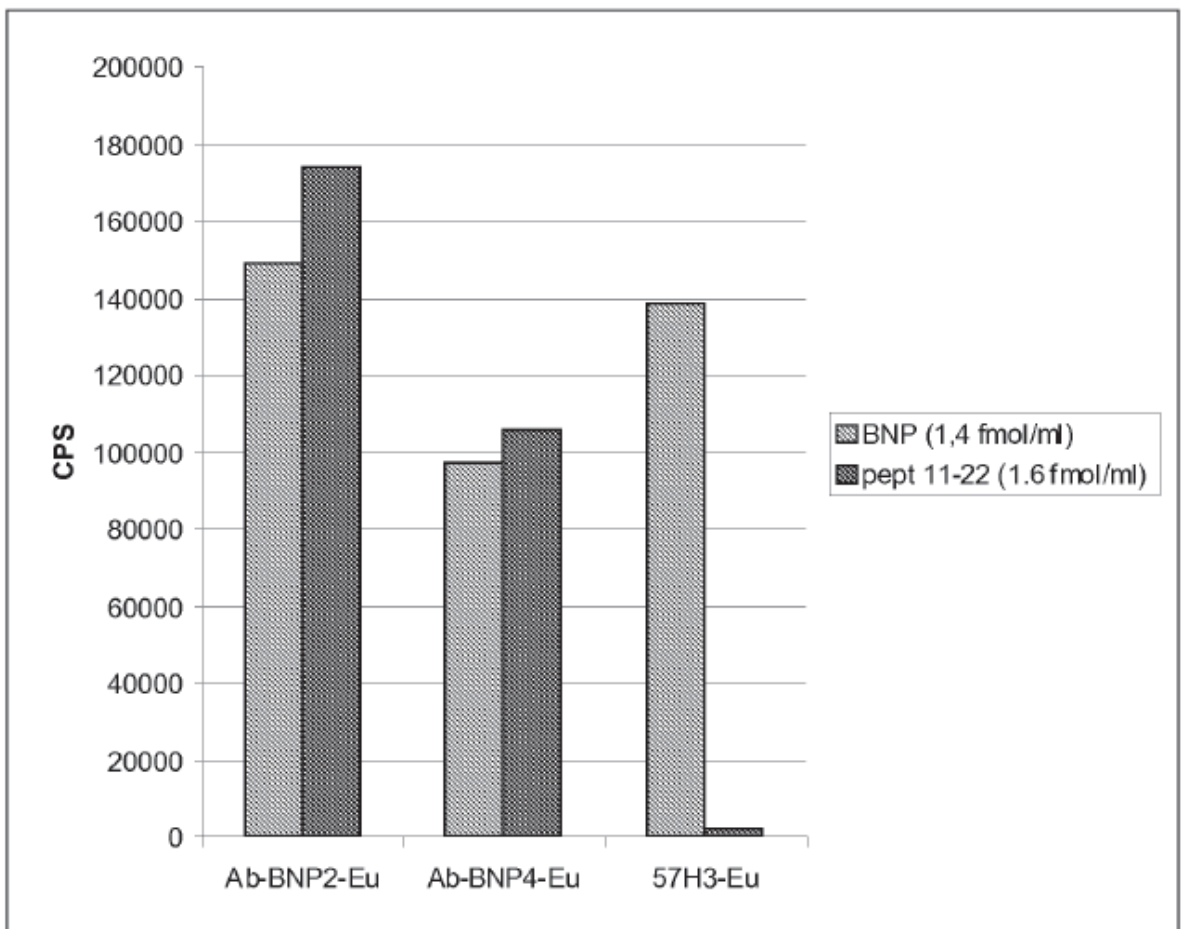


Fig. 3

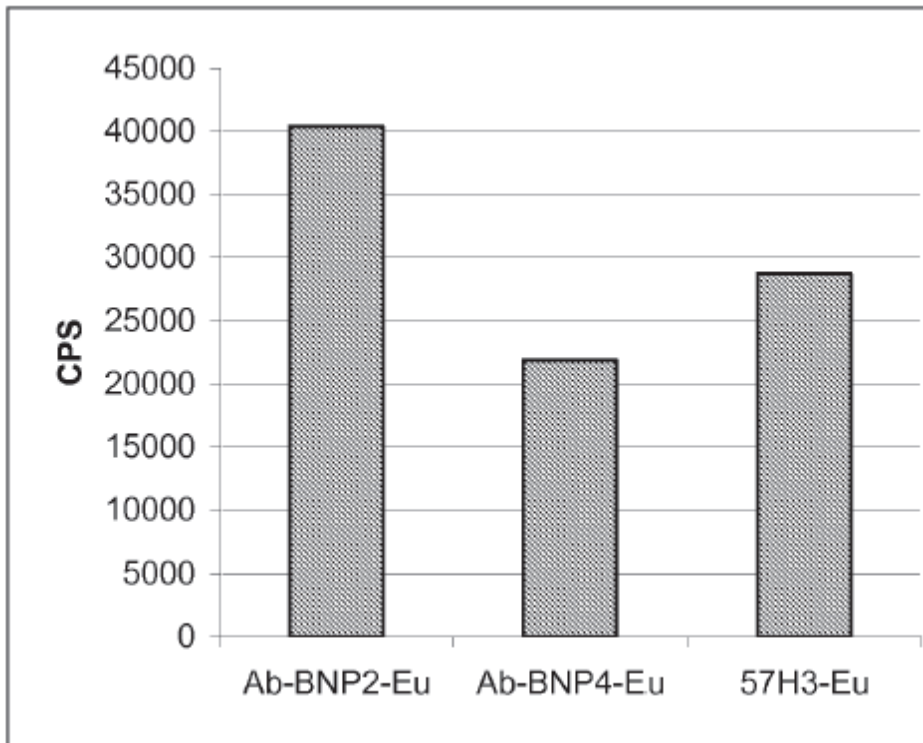


Fig. 4

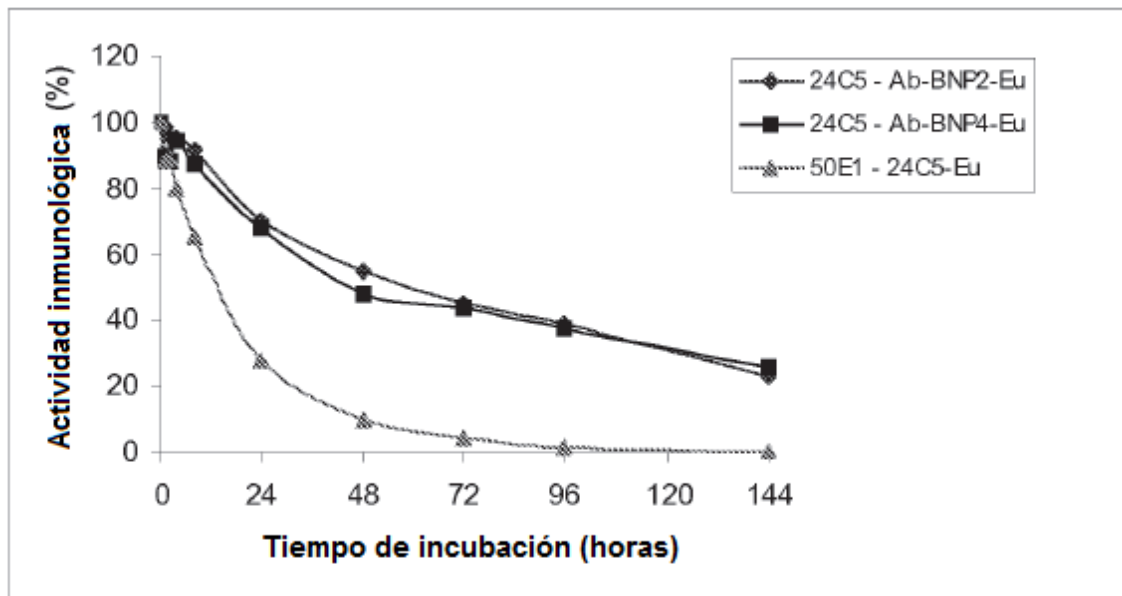


Fig. 5

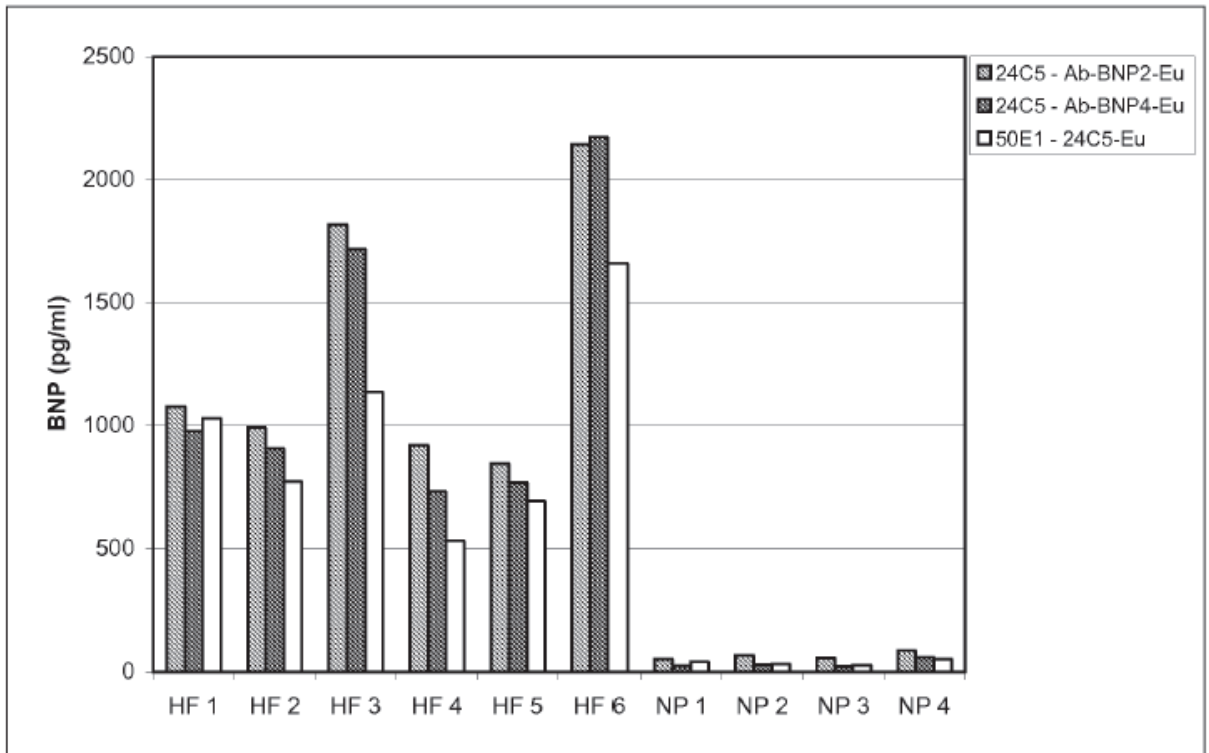


Fig. 6

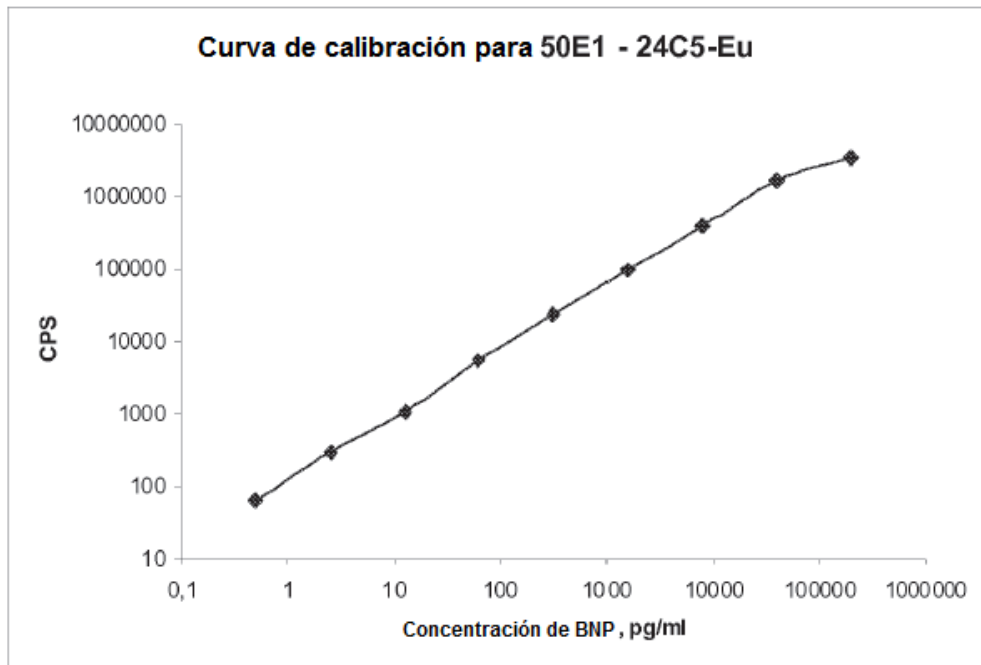
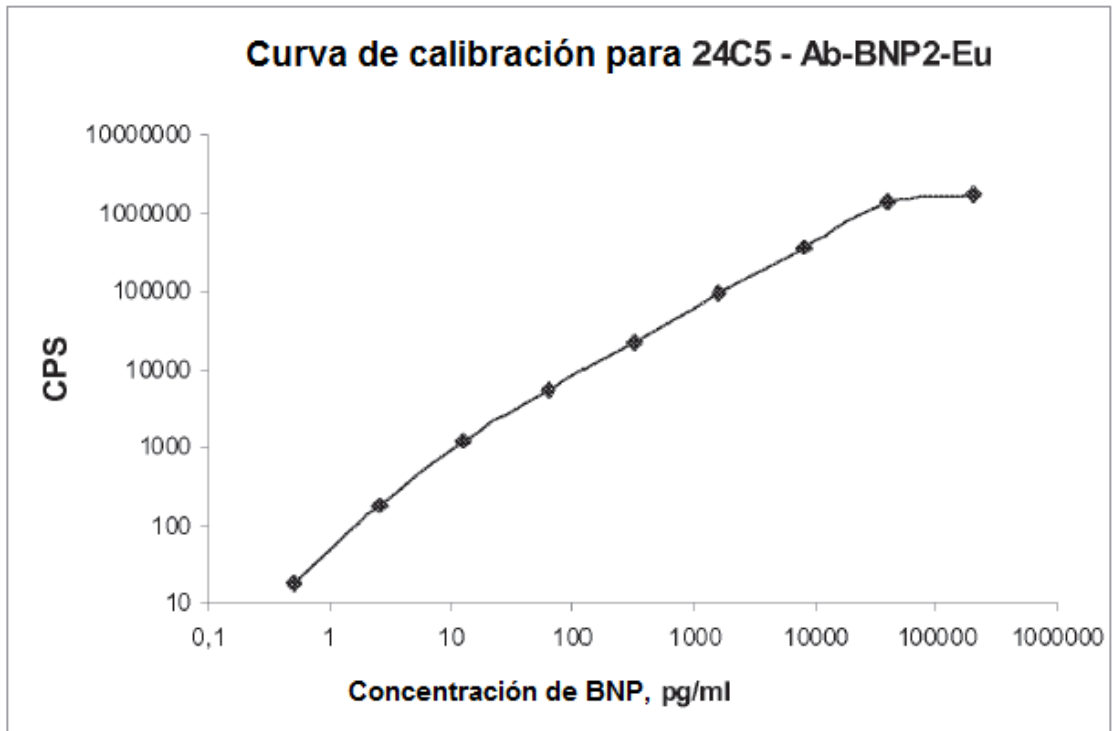
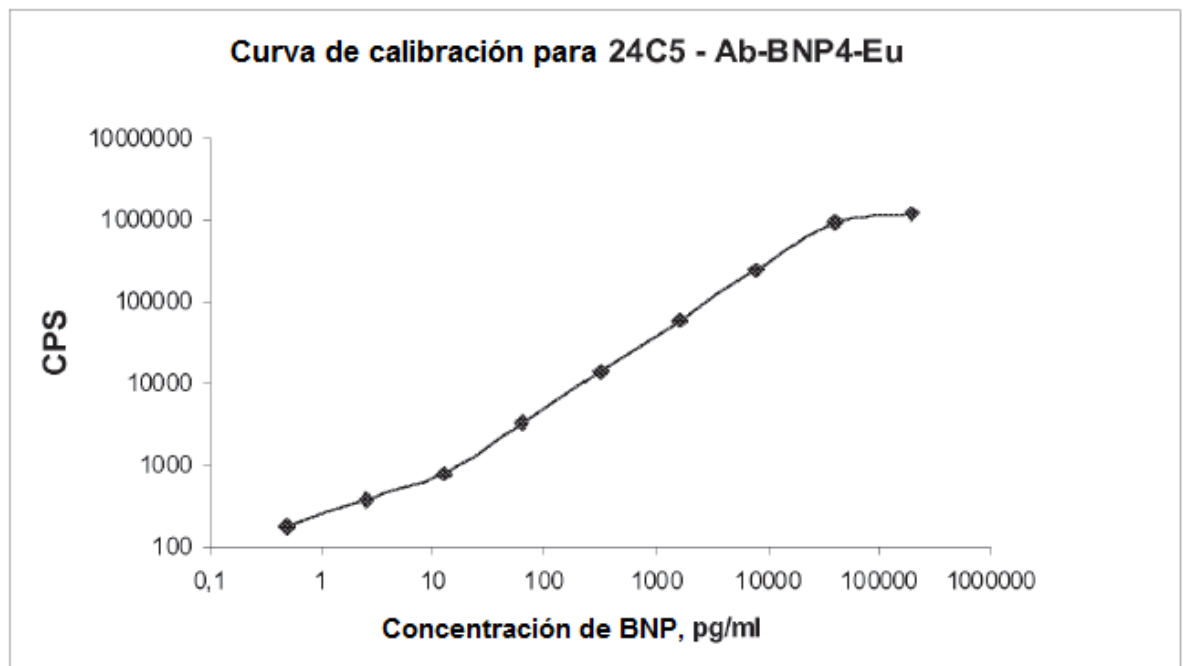


Fig. 7A



**Fig. 7B**



**Fig. 7C**