

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 211**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/EP2012/072928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO2013072509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12791143 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2780717**

54 Título: **Ensayos de adrenomedulina y métodos para determinar la adrenomedulina madura**

30 Prioridad:

16.11.2011 EP 11189450 16.11.2011 EP 11189447
16.11.2011 EP 11189448 16.11.2011 EP 11189449
16.11.2011 EP 11189452 16.03.2012 EP 12160018
16.03.2012 EP 12160014 16.03.2012 EP 12160016
16.03.2012 EP 12160017 16.03.2012 EP 12160015
27.09.2012 EP 12186449

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.06.2017

73 Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 15a
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 617 211 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayos de adrenomedulina y métodos para determinar la adrenomedulina madura.

- 5 El objeto de la presente invención es un método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos, en el que se determina la concentración de ADM 1-52 madura y/o de ADM 1-52-Gly madura en una muestra de líquido corporal de dicho paciente séptico utilizando un ensayo que comprende dos agentes de unión que se seleccionan de entre el grupo que comprende un anticuerpo antiadrenomedulina y un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a ADM y que se une a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina madura y/o de la adrenomedulina-Gly que es los aminoácidos 21-52-amida de SEC ID nº 1 o los aminoácidos 21-52-Gly de SEC ID nº 2, en la que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

El objeto de la presente invención son además unos ensayos y métodos de calibración.

- 15 El péptido adrenomedulina (ADM) fue descrito por primera vez por Kitamura et al. (ver 1; los datos numéricos se basan en la lista de referencias adjunta) como nuevo péptido hipotensor que comprende 52 aminoácidos, que había sido aislado a partir de un feocromocitoma humano. En el mismo año, también se describió un ADNc codificante de un péptido precursor que comprendía 185 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos completa de dicho péptido precursor. El péptido precursor, que comprende, entre otros, una secuencia de señal de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, se denomina "preproadrenomedulina" (pre-proADM). La pre-proADM comprende 185 aminoácidos y presenta la secuencia SEC ID nº 3. La ADM madura se muestra en la SEC ID nº 4 y la ADM-Gly madura se muestra en la SEC ID nº 5.

- 25 El péptido adrenomedulina (ADM) es un péptido que comprende 52 aminoácidos (SEC ID nº 2) y que comprende los aminoácidos 95 a 146 de pre-proADM, a partir del cual se forma mediante corte proteolítico. Hasta hoy, sustancialmente sólo se han caracterizado con más precisión unos cuantos fragmentos de los fragmentos peptídicos formados en el corte de la pre-proADM, en particular los péptidos fisiológicamente activos adrenomedulina (ADM) y "PAMP", un péptido que comprende 20 aminoácidos (22-41) que sigue a los 21 aminoácidos del péptido de señal en pre-proADM. Para tanto ADM como PAMP, adicionalmente se han descubierto e investigado en mayor detalle subfragmentos fisiológicamente activos. El descubrimiento y caracterización de ADM en 1993 ha generado una intensa actividad investigadora y un alud de publicaciones, los resultados de las cuales se han resumido recientemente en diversos artículos de revisión, haciendo referencia en particular en el contexto de la presente descripción a los artículos en una publicación de "Peptides" dedicada a la ADM (Peptides 22, 2001), en particular (2) y (3). Una revisión adicional es (4). En las investigaciones científicas hasta el momento se ha descubierto, entre otras cosas, que la ADM puede considerarse un péptido regulador polifuncional. Resulta liberado a la circulación en una forma inactiva extendida por glicina (5). También existe una proteína de unión (6) que es específica para ADM y que de manera similar probablemente modula el efecto de la ADM.

- 40 Dichos efectos fisiológicos de la ADM, así como de PAMP, que son de importancia principal en las investigaciones hasta el momento, fueron los efectos que influían sobre la presión sanguínea. De esta manera, la ADM es un vasodilatador eficaz, siendo posible asociar el efecto hipotensor con segmentos peptídicos particulares en la parte C-terminal de la ADM.

- 45 Se ha descubierto además que el péptido PAMP fisiológicamente activo adicional anteriormente indicado formado a partir de pre-proADM muestra de manera similar un efecto hipotensor, aunque aparentemente presenta un mecanismo de acción que difiere del de la ADM (ver, además de los artículos de revisión anteriormente indicados (3) y (4), también (7), (8) o (9) y (10)).

- 50 Se ha descubierto además que las concentraciones de ADM que pueden medirse en la circulación y en otros líquidos biológicos se encuentran, en varios estados patológicos, significativamente elevados respecto a las concentraciones observadas en las personas sanas de control. De esta manera, el nivel de ADM de los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades renales, trastornos hipertensores, diabetes mellitus, en etapa aguda de choque y en la sepsis y el choque séptico se encuentran significativamente incrementadas, aunque en diferentes grados. Las concentraciones de PAMP también se encuentran incrementadas en algunos de dichos estados patológicos, aunque los niveles plasmáticos se encuentran reducidos respecto a la ADM ((3), página 1.702).

- 60 Es conocido además que las concentraciones inusualmente elevadas de ADM se observan en la sepsis o en el choque séptico (ver (3) y (11), (12), (13), (14) y (15)). Los resultados se relacionan con los cambios hemodinámicos típicos que se conocen como fenómenos típicos del curso de la enfermedad en pacientes con sepsis y otros síndromes severos, tales como, por ejemplo, SIRS.

- 65 Aunque se supone que la ADM y PAMP se forman a partir del mismo péptido precursor, pre-proADM (SEC ID nº 3), en el que las secuencias de aminoácidos correspondientes a dichos péptidos se encuentran presentes como péptidos parciales en cantidades equimolares, las concentraciones de ADM o PAMP medibles en los líquidos biológicos aparentemente son diferentes. Lo anterior no resulta inusual.

De esta manera, las concentraciones medibles de los diferentes productos de degradación del mismo péptido precursor pueden ser diferentes, por ejemplo porque son el resultado de diferentes rutas de degradación que compiten entre sí y que, por ejemplo en el caso de diferentes estados patológicos, conducen a una fragmentación diferente de un péptido precursor y, por lo tanto, a diferentes productos de degradación. Determinados péptidos parciales contenidos en el péptido precursor pueden formarse como péptidos libres o pueden no formarse, y/o se forman péptidos diferentes de maneras diferentes y en cantidades diferentes. Aunque se siga una única ruta de degradación para el procesamiento de un péptido precursor y por lo tanto todos los productos de degradación se originen de un único péptido precursor y seguramente se hayan formado ellos mismos principalmente en cantidades equimolares, las concentraciones de estado estacionario de diferentes péptidos parciales y fragmentos medibles en líquidos biológicos pueden ser muy diferentes, es decir, por ejemplo, en el caso de que se formen fragmentos individuales a una tasa diferentes y/o presentan estabilidades (tiempos de vida) individuales en el líquido biológico respectivo, o en el caso de que resulten eliminados de la circulación basándose en diferentes mecanismos de eliminación y/o diferentes tasas de eliminación.

La adrenomedulina desempeña papeles cruciales durante el desarrollo de sepsis ((16), (17)) y en numerosas enfermedades agudas y crónicas ((18), (4)).

La ADM se encuentra elevada en la sepsis y es pronóstico del resultado de la sepsis ((19), (14), (11)). El seguimiento del tratamiento de la sepsis para la monitorización temprana del éxito o fracaso del tratamiento sigue siendo una necesidad clínica no satisfecha sustancial.

Actualmente no existen ensayos de ADM adecuados para el diagnóstico rutinario. La sensibilidad de los ensayos actualmente disponibles para determinar la ADM madura es excesivamente reducida. Por lo tanto, se requiere un volumen de plasma elevado para el análisis. Además, los ensayos actualmente disponibles muestran limitaciones preanalíticas relacionadas con la estabilidad, por ejemplo las muestras necesitan estabilizarse con aprotinina ((20), (21)). Además, algunos ensayos de ADM requieren una preparación extensiva de las muestras antes de las mediciones (11).

Lynley K. Lewis et al. comentan las dificultades asociadas a la medición de la ADM en el plasma humano en una publicación titulada "Adrenomedullin (1-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage", Clinical Chemistry 44(3):571-577, 1998.

Kazuo Kitamura et al. enseñan que la forma molecular principal de la ADM inmunorreactiva en el plasma humana es la ADM extendida con glicina (ADM-gly) y que la concentración de la ADM madura en el plasma humano es baja, en una publicación titulada "The Intermediate Form of Glycine-Extended Adrenomedullin is the Major Circulating Molecular Form in Human Plasma", Biochemical and Biophysical Research Communications 244:551-555, 1998.

El documento n° WO2004/090546A1 da a conocer un método para identificar la inmunorreactividad de la ADM en líquidos biológicos con fines diagnósticos mediante la medición de un péptido parcial de la región intermedia de la proadrenomedulina que comprende los aminoácidos 45 a 92 de la preadrenomedulina completa.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un ensayo que resulta adecuado como método rutinario para la medición directa de la ADM madura adecuada para las tecnologías estándares automatizadas de laboratorio y de punto de atención.

Inesperadamente ha resultado que dicho ensayo puede utilizarse para el seguimiento del tratamiento en pacientes sépticos.

Es un objeto de la presente invención un método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos, en el que la concentración de ADM 1-52 madura y/o ADM 1-52-Gly madura en una muestra de líquido corporal de dicho paciente séptico se determina utilizando un ensayo que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly que es aminoácidos 21-52-amida SEC ID n° 1 o aminoácidos 21-52-Gly SEC ID n° 2, en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

En una forma de realización de la invención, un objeto es un método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos en el que uno de dichos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM madura y/o la ADM 1-52-Gly madura:

ADM 21-32: CTVQKLAHQIYQ (SEC ID n° 6)

y en la que dicho segundo agente de unión de dichos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM madura y/o la ADM 1-52-Gly madura:

ADM 42-52: APRSKISPQGY (SEC ID n° 7)

En una forma de realización de la invención, la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo es capaz de cuantificar la ADN de los sujetos sanos y es <10 pg/ml, preferentemente <40 pg/ml y más preferentemente <70 pg/ml.

En una forma de realización de la invención, dicho agente de unión muestra una afinidad de unión para la ADM madura y/o la ADM 1-52-Gly madura de por lo menos 10^7 M^{-1} , preferentemente 10^8 M^{-1} , la afinidad preferente es superior a 10^9 M^{-1} , más preferentemente superior a 10^{10} M^{-1} . El experto en la materia conocerá que puede considerarse compensar la afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más elevada de compuestos y dicha medida no conduciría a salirse del alcance de la invención.

Con el fin de determinar la afinidad de los anticuerpos para la adrenomedulina, se determinó la cinética de unión de la adrenomedulina a anticuerpo inmovilizado mediante resonancia de plasmón superficial libre de marcaje utilizando un sistema Biacore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Se llevó a cabo la inmovilización reversible de los anticuerpos utilizando un anticuerpo anti-Fc de ratón acoplado covalentemente con alta densidad con una superficie de sensor CM5 siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de captura de anticuerpo de ratón; GE Healthcare) (22).

En una forma de realización de la invención dicho agente de unión se selecciona del grupo que comprende un anticuerpo antiadrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM de unión a ADN.

La expresión seguimiento de la terapia se refiere a que se determina en una muestra por lo menos una vez la concentración de la ADM madura 1-52 (SEC ID nº 4) y/o de la ADM 1-52-Gly madura (SEC ID nº 5), preferentemente más de una vez, preferentemente dos veces o una vez al día después del inicio de la terapia.

En una forma de realización de la invención puede ser un denominado ensayo POC (punto de atención), que es una tecnología de ensayo que permite realizar el ensayo en menos de 1 hora en proximidad al paciente sin necesidad de un sistema de ensayo totalmente automático. Un ejemplo de esta tecnología es la tecnología de ensayo inmunocromatográfica.

En una forma de realización de la invención, dicho ensayo es un inmunoensayo de tipo sándwich utilizando cualquier tipo de tecnología de detección, que incluye de manera no limitativa, marcador enzimático, marcador quimioluminiscente, marcador electroquimioluminiscente, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. En una forma de realización de la invención, dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich marcado con enzima. Los ejemplos de ensayo automatizado o totalmente automatizado comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los sistemas siguientes: Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centaur®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas® o Alere Triage®.

Se conoce una diversidad de ensayos inmunológicos y pueden utilizarse para los ensayos y métodos de la presente invención, entre ellos se incluyen: radioinmunoensayos ("RIA"), ensayos inmunológicos multiplicados por enzimas ("EMIT") homogéneos, ensayos de inmunoadsorción ligados a enzima ("ELISA"), inmunoensayos de reactivación de apoenzimas ("ARIS"), ensayos inmunológicos de tira reactiva y ensayos inmunocromatográficos.

En una forma de realización de la invención por lo menos uno de dichos agentes de unión se marca con el fin de ser detectado.

Los métodos de detección preferidos comprenden ensayos inmunológicos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA), los ensayos inmunológicos de quimioluminiscencia y de fluorescencia, los ensayos inmunológicos ligados a enzima (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas y formatos de ensayo rápido, tales como, por ejemplo, las tiras reactivas inmunocromatográficas.

En una forma de realización preferida, dicho marcador se selecciona de entre el grupo que comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador fluorescente y un marcador de yodo radioactivo.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, competitivos y no competitivos. En una forma de realización, el ensayo se encuentra en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un ensayo inmunológico no competitivo, en el que la molécula que debe detectarse y/o cuantificarse se une a un primer anticuerpo o a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se encuentra marcado, por ejemplo con un pigmento, con un isótopo radioactivo o una fracción reactiva o catalíticamente activa. A continuación, se midió la cantidad de anticuerpo marcado unido al analito mediante un método apropiado. La composición general y procedimientos que incluyen los "ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia (23).

En otra forma de realización, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos, los cuales se encuentran ambos presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en la que un primer

componente de marcaje se encuentra unido a la primera molécula de captura, en el que dicho componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la inhibición o amplificación de la fluorescencia o de la quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de manera que con la unión de ambas moléculas de captura al analito se genera una señal medible que permite la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

En otra forma de realización, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierra rara o quelatos de tierra rara en combinación con pigmento fluorescente o pigmento quimioluminiscente, en particular un pigmento del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en la fluorescencia comprenden la utilización de pigmentos, que pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, pigmentos cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxi-rodamina-6G (R6G5), 6-carboxi-rodamina-6G (RG6), rodamina, verde rodamina, rojo rodamina, rodamina 110, pigmentos BODIPY, tales como BODIPY TIMR, verde Oregon, coumarinas tales como umbeliferona, bencimidias tales como Hoechst 33258, fenantridinas tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa flúor, PET, bromuro de etidio, pigmentos de acridinio, pigmentos de carbazol, pigmentos de fenoxazina, pigmentos de porfirina, pigmentos de polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden la utilización de pigmentos, basándose en los principios físicos descritos para los materiales quimioluminiscentes en (24). Los pigmentos quimioluminiscentes preferidos son los ésteres de acridinio.

Tal como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo diagnóstico" puede ser cualquier tipo aplicado en el campo de los diagnósticos. Dicho ensayo puede basarse en la unión de un analito que debe detectarse a una o más sondas de captura con una determinada afinidad. Respecto a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad preferentemente es superior a 10^8 M^{-1} .

En el contexto de la presente exposición, las "moléculas de unión" son moléculas que pueden utilizarse para la unión a moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente exposición PCT y fragmentos de la misma) de una muestra. De esta manera, las moléculas de unión deben conformarse adecuadamente, tanto espacialmente como en términos de características superficiales, tales como la carga superficial, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unirse específicamente a las moléculas diana o moléculas de interés. En la presente memoria la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de van der Waals, pi-pi, Sigma-pi, hidrófobas o de enlace hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones anteriormente indicadas entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés. En el contexto de la presente exposición las moléculas de unión pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende una molécula de ácidos nucleicos, una molécula de carbohidrato, una molécula de APN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glucoproteína. Preferentemente, las moléculas de unión son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos con suficiente afinidad para una diana o molécula de interés, e incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo recombinante, así como derivados modificados química y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de por lo menos 12 aminoácidos de la misma.

El marcador quimioluminiscente puede ser un marcador de éster de acridinio, marcadores esteroides que implican marcadores de isoluminol y similares.

Los marcadores enzimáticos pueden ser lactato deshidrogenasa (LDH), creatincinasa (CPK), fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ATL), fosfatasa ácida, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, etc.

En una forma de realización de la invención por lo menos uno de los dos agentes de unión según las reivindicaciones se une a una fase sólida como partículas magnéticas y superficies de poliestireno.

En una forma de realización de la invención, la concentración de la ADM 1-52 madura y/o la ADM 1-52-Gly madura medida en la muestra se encuentra comprendida en el intervalo de entre 10 y 500 pg/ml en plasma o suero.

Los niveles de ADM de la presente invención se determinaron con el ensayo de ADM descrito. Los valores anteriormente indicados podrían ser diferentes en otros ensayos de ADM, dependiendo de su modo de calibración. Los valores anteriormente indicados podrían aplicarse a dichos ensayos de ADM calibrados de manera diferente de acuerdo con lo anteriormente indicado, considerando las diferencias de calibración. Los ensayos de ADM podrían calibrarse mediante correlación y ajuste mediante sus intervalos normales (población sana). Alternativamente,

podrían utilizarse muestras de control disponibles comercialmente para el ajuste de diferentes calibraciones (ICI Diagnostics, Berlin, Alemania). Con el ensayo de ADM anteriormente indicado, se ha determinado que la mediana de una población normal es de 24,7 pg/ml.

5 En una forma de realización de la invención resulta de aplicación un umbral por el que un valor superior al umbral es indicativo de que un paciente que no responde o responde mal a la terapia, mientras que un valor inferior a dicho umbral es indicativo de que un paciente responde a la terapia.

10 En una forma de realización de la invención resulta de aplicación un umbral de entre 60 y 80 pg/ml, preferentemente de 70 pg/ml.

En una forma de realización de la invención, dicha muestra se selecciona de entre el grupo que comprende plasma citrato, plasma heparina, plasma EDTA y sangre completa humanos.

15 En una forma de realización de la invención dicha muestra extraída se mide directamente sin ninguna preparación adicional de la muestra.

20 En una forma de realización de la invención, dicho método se lleva a cabo en un dispositivo totalmente automatizado Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centaur®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas® o Alere Triage®.

25 En una forma de realización de la invención, se determina la ADM 1-52 madura y/o la ADM 1-52-Gly madura en por lo menos dos muestras, en la que dichas muestras se extraen en puntos temporales diferentes de dichos pacientes sépticos. Dichas muestras pueden extraerse una vez al día durante los días de terapia. Puede aplicarse un régimen diagnóstico tal como se ha descrito para otros marcadores biológicos, por ejemplo (25) y también (26). En una forma de realización de la invención el volumen de muestra medido es inferior o igual a 50 µl.

30 El método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según la presente invención puede combinarse con otros parámetros clínicos y/o de laboratorio adicionales o puntuaciones clínicas, tales como, por ejemplo, la puntuación Apache 2, la puntuación SOFA, u otras, o uno o más parámetros contenidos en la puntuación. Pueden combinarse los parámetros variables continua o discontinuamente utilizando herramientas estadísticas estándares.

35 La materia objeto de la invención es adicionalmente un ensayo para determinar la adrenomedulina y/o adrenomedulina-Gly madura en una muestra que comprende dos agentes de unión según las reivindicaciones que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina madura y/o de la adrenomedulina-Gly que son los aminoácidos 21-52-amida SEC ID nº 1 o los aminoácidos 21-52-Gly SEC ID nº 2 de la adrenomedulina madura, en la que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos y en la que dicho ensayo no es un ensayo manual de tipo sándwich de tubo recubierto-éster de acridinio.

40 La materia objeto de la invención es además un ensayo para determinar la adrenomedulina madura y/o adrenomedulina-Gly y/o adrenomedulina-Gly en una muestra que comprende unos agentes de unión según las reivindicaciones que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly que son los aminoácidos 21-52-amida SEC ID nº 1 o los aminoácidos 21-52-Gly de la adrenomedulina madura SEC ID nº 2, en la que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos y en la que dicho ensayo es un ensayo manual de tipo sándwich de tubo recubierto-éster de acridinio y en la que uno de dichos agentes de unión es un anticuerpo que se une a la SEC ID nº 4 y en la que el segundo de dichos agentes de unión es un anticuerpo que se une a la SEC ID nº 7 (APRSKISPQGY-CO-NH₂).

50 En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención uno de dichos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM madura:

CTVQKLAHQIQ (SEC ID nº 6)

55 y en la que el segundo de dichos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM madura:

APRSKISPQGY (SEC ID nº 7)

60 En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo permite cuantificar la ADM de los sujetos sanos y es <10 pg/ml, preferentemente <40 pg/ml y más preferentemente <70 pg/ml.

65 En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, dicho agente de unión muestra una afinidad de unión para la adrenomedulina de por lo menos 10⁷ M⁻¹, preferentemente 10⁸ M⁻¹; la constante de afinidad preferentemente es

superior a 10^9 M^{-1} , más preferentemente es superior a 10^{10} M^{-1} . El experto en la materia conoce que puede considerarse compensar la menor afinidad mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y que esta medida no conduciría a salirse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse tal como se ha indicado anteriormente.

5

En los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, dicho agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo antiadrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM de unión a ADM según las reivindicaciones.

10

En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. Puede ser un ELISA totalmente automatizado o manual. Puede ser un denominado ensayo PCT (punto de atención). Los ejemplos de ensayos automatizados o totalmente automatizados comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los sistemas a continuación: Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centaur®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas® o Alere Triage®. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de formatos de ensayo.

15

20

En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se marca con el fin de ser detectado. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de marcadores.

25

En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se une a una fase sólida. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de fases sólidas.

30

En una forma de realización de los ensayos para determinar la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly en una muestra según la presente invención, dicho marcador se selecciona de entre el grupo que comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador fluorescente y un marcador de yodo radioactivo.

35

Un objeto adicional de la presente invención es un método de calibración de un ensayo según la presente invención en el que el agente de unión, un anticuerpo, se utiliza para la unión a una región de por lo menos 5 aminoácidos dentro de la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly aminoácidos 1-16 (SEC ID nº 8). Dicho agente de unión es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una región de por lo menos 5 aminoácidos dentro de la adrenomedulina madura y/o la adrenomedulina-Gly aminoácidos 1-16 (SEC ID nº 8).

40

En una forma de realización del método de calibración de un ensayo según la invención, dicho anticuerpo o fragmento N-terminal reconoce y se une al extremo N-terminal (aal) de la adrenomedulina madura y/o de la adrenomedulina-Gly. Lo anterior significa en otra forma de realización preferente que dicho anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo antiadrenomedulina se une únicamente a una región dentro de la secuencia de la ADM madura en el caso de que el extremo N-terminal de la ADM se encuentre libre. En dicha forma de realización, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo antiadrenomedulina no se uniría a una región dentro de la secuencia de la ADM madura en el caso de que dicha secuencia se encontrase comprendida dentro de la pro-ADM.

45

50

Los anticuerpos adecuados para calibrar un ensayo según la invención son agentes de unión que reducen las propiedades de adsorción de la ADM. Además, dicho agente de unión debe ser compatible con los agentes de unión utilizados en el ensayo de detección, por ejemplo, dicho agente de unión no debería interferir con la unión del agente de unión marcado y el agente de unión de fase sólida en el caso de un ELISA.

55

Los presentes métodos y ensayos resultan adecuados para las aplicaciones rutinarias. Las aplicaciones rutinarias requieren en la mayoría de casos que el volumen de muestra necesario no exceda de 50 µl. La aplicación rutinaria requiere además que los tratamientos preanalíticos se mantengan en un mínimo o que sean cero (utilización de muestras rutinarias como plasma-EDTA o plasma-citrato). Los requisitos preanalíticos deben adaptarse a la rutina clínica: mínima estabilidad del analito (>90% de recuperación) a temperatura ambiente debe ser de por lo menos 2 horas.

60

Un anticuerpo según la presente invención es una proteína que incluye uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina que se unen específicamente a un antígeno. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA), gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), delta (IgD), epsilon (IgE) y mu (IgM), así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa generalmente son de aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa generalmente son de aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos de longitud. Las cadenas ligeras están

65

codificadas por un gen de región variable en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH-terminal. Las cadenas pesadas de manera similar están codificadas por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos de longitud) y uno de los otros genes de región constante.

La unidad estructural básica de un anticuerpo generalmente es un tetrámero que consiste de dos parejas idénticas de cadenas de inmunoglobulina, presentando cada pareja una cadena ligera y una cadena pesada. En cada pareja, las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada se unen a un antígeno y las regiones constantes median en funciones efectoras. Las inmunoglobulinas también existen en una diversidad de otras formas, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab')₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales y cadenas sencillas ((27), (28), (29), (30) y (31)). Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina incluye una región marco interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (RDC), ver (32). Tal como se ha indicado anteriormente, las RDC son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Un complejo inmunológico es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, o un fragmento de anticuerpo funcional, que se une específicamente a un antígeno.

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos los genes de cadena ligera y pesada de los cuales han sido construidos, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de genes de región variable y de región constante de inmunoglobulina pertenecientes a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como kappa y gamma 1 o gamma 3. En un ejemplo, de esta manera, un anticuerpo quimérico terapéutico es una proteína híbrida compuesta del dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, aunque pueden utilizarse otras especies de mamífero, o la región variable puede producirse mediante técnicas moleculares. Los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos son bien conocidos de la técnica, por ejemplo ver (33). Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más RDC de una inmunoglobulina no humana (tal como de ratón, de rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las RDC se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptora". En una forma de realización, la totalidad de las RDC proceden de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no es necesario que se encuentren presentes pero, en caso de encontrarse presentes, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, idénticas por lo menos al aproximadamente 85%-90%, tal como idénticas aproximadamente al 95% o más. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las RDC, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana naturales. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las RDC. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede presentar un número limitado de sustituciones por aminoácidos obtenidos del marco donante. Los anticuerpos monoclonales humanizados o de otro tipo pueden presentar sustituciones adicionales de aminoácidos conservadores que no presentan sustancialmente ningún efecto sobre la unión de los antígenos u otras funciones de la inmunoglobulina. Las sustituciones conservadoras ejemplares son sustituciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr. Las inmunoglobulinas humanizadas pueden construirse mediante ingeniería genética por ejemplo ver (34)). Un anticuerpo humano es un anticuerpo en el que los genes de cadena ligera y de cadena pesada son de origen humano. Pueden generarse anticuerpos humanos utilizando métodos conocidos de la técnica. Pueden producirse anticuerpos humanos mediante la inmortalización de una célula B humana secretora del anticuerpo de interés. La inmortalización puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, la infección por VEB o mediante la fusión de una célula B humana con una célula de mieloma o de hibridoma, produciendo una célula de trioma. También pueden producirse anticuerpos humanos mediante métodos de expresión fágica (ver, por ejemplo, (35), (36) y (37)) o seleccionarse de una biblioteca combinatorial humana de anticuerpos monoclonales (ver el sitio de internet de Morphosys). También pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la utilización de animales transgénicos portadores de un gen de inmunoglobulina humana (por ejemplo ver (38) y (39)).

De esta manera, el anticuerpo de ADM puede presentar los formatos conocidos de la técnica. Son ejemplos los anticuerpos humanos, los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos injertados con RDC. En una forma de realización preferida, los anticuerpos según la presente invención son anticuerpos producidos recombinantemente, tales como, por ejemplo, IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio F-variable de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno), incluyendo de manera no limitativa fragmentos Fab tales como minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas epítipo, por ejemplo Fab-V5Sx2, Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3, Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo formado mediante multimerización con ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo mediante la dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalente y/o multispecíficos multimerizados, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo de una clase diferente de G, anticuerpos de dominio único, por ejemplo nanocuerpos

derivados de camélido o inmunoglobulinas de pescado y numerosos otros.

Además de los anticuerpos anti-ADM, son bien conocidos en la técnica otros andamiajes de biopolímero para el acomplejamiento de una molécula diana, que han sido utilizados para la generación de biopolímeros altamente específicos de la diana. Son ejemplos los aptámeros, los espiégelmeros, las anticalinas y las conotoxinas.

En una forma de realización preferida, el formato de anticuerpo de ADM se selecciona de entre el grupo que comprende fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab, fragmento scFab, fragmento (Fab)₂ y proteína de fusión scFv-Fc. En otra forma realización preferente, el formato de anticuerpo se selecciona de entre el grupo que comprende fragmento scFab, fragmento Fab, fragmento scFv y conjugados de biodisponibilidad optimizada de los mismos, tales como fragmentos PEGilados. Uno de los formatos más preferentes es el formato scFab.

En otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo de unión a ADM es un anticuerpo monoespecífico. Los anticuerpos monoespecíficos son anticuerpos que presentan afinidad para el mismo antígeno. Los anticuerpos monoclonales son monoespecíficos, aunque también pueden producirse anticuerpos monoespecíficos por medios diferentes de la producción a partir de una célula germinal común.

En una forma de realización preferida de la invención pueden producirse anticuerpos según la presente invención de la manera siguiente:

se inmunizó un ratón Balb/c con 100 µg de conjugado de péptido ADM-BSA los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de llevar a cabo el experimento de fusión, los animales recibieron 50 µg del conjugado disueltos en 100 µl de solución salina, administrados en forma de una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

Los esplenocitos del ratón inmunizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras el lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos mediante crecimiento en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% y complemento HAT]. Tras dos semanas, se sustituyó el medio HAT por medio HT durante tres pases, seguido del retorno al medio de cultivo celular normal.

Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a un cribado primario para anticuerpos de IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Se transfirieron los microcultivos con resultado positivos en el ensayo a placas de 24 pocillos para la propagación. Tras someter a ensayo nuevamente, los cultivos seleccionados se clonaron y reclonaron utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos (ver también (51) y (52)).

Pueden producirse anticuerpos mediante expresión fágica siguiendo el procedimiento siguiente:

se utilizaron las bibliotecas génicas de anticuerpos no expuestos humanos HAL7/8 para el aislamiento de dominios F variables de cadena sencilla (scFv) contra el péptido adrenomedulina. Las bibliotecas génicas de anticuerpo se cribaron con una estrategia selectiva que comprendía la utilización de péptidos que contenían una etiqueta de biotina unida mediante dos espaciadores diferentes a la secuencia del péptido adrenomedulina. Se utilizó una mezcla de rondas de selección utilizando antígeno unido no específicamente y antígeno unido a la estreptavidina, con el fin de minimizar el fondo de agentes de unión no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda de selección se utilizaron para la generación de cepas de *E. coli* expresantes de scFv monoclonal. El sobrenadante del cultivo de dichas cepas clonales se utilizó directamente para un ensayo ELISA de antígeno ((53) y (54)).

La humanización de los anticuerpos murinos puede llevarse a cabo siguiendo el procedimiento siguiente:

para la humanización de un anticuerpo de origen murino, se analiza la secuencia de anticuerpo para la interacción estructural de las regiones marco (RM) con las regiones determinantes de complementariedad (RDC) y el antígeno. Basándose en el modelaje estructural, se selecciona un RM apropiado de origen humano y las secuencias de RDC murinas se trasplantan en el RM humano. Pueden introducirse variaciones en la secuencia de aminoácidos de las RDC o de las RM para recuperar interacciones estructurales que resultaron anuladas por el cambio de especie para las secuencias de RM. Esta recuperación de las interacciones estructurales puede conseguirse mediante un enfoque aleatorio utilizando bibliotecas de expresión fágica o mediante un enfoque dirigido guiado por el modelaje molecular (55).

Desarrollo de anticuerpos

Los presentes inventores desarrollaron anticuerpos monoclonales de ratón de unión a la parte N-terminal, de región intermedia y C-terminal de la ADM_h y se determinaron las constantes de afinidad de los mismos (Tabla 1).

Péptidos para la inmunización

Los péptidos fueron suministrados por JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Alemania). Los péptidos se acoplaron a BSA utilizando el método de entrecruzamiento de Sulfo-SMCC. El procedimiento de entrecruzamiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher/Pierce).

Ejemplo 1Generación de anticuerpos y determinación de las constantes de afinidad de los mismos

Se generaron los anticuerpos murinos con el método siguiente:

se inmunizó un ratón Balb/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionados en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de llevar a cabo el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disueltos en 100 µl de solución salina, administrados en forma de una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

Los esplenocitos del ratón inmunizado y de las células de la línea celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras el lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos mediante cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% y complemento HAT]. Tras dos semanas, se sustituyó el medio HAT por medio HT durante tres pases, seguido del retorno a medio de cultivo celular normal.

Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a cribado primario para los anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos con resultado positivo en el ensayo se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Tras someter a ensayo nuevamente, los cultivos seleccionados se clonaron y se reclonaron utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos ((51) y (52)).

Tabla 1:

Antígeno/inmunógeno	Región de la ADM	Denominación	Constantes de afinidad, K_d (M^{-1})
YRQSMNNFQGLRSFGC	1-16	NT-ADM	$1,6 \times 10^9$
CTVQKLAHQIYQ	21-32	MR-ADM	2×10^9
CAPRSKISPQGY-NH ₂	C-42-52	CT-ADM	$1,1 \times 10^9$

Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron anticuerpos mediante métodos estándares de producción de anticuerpos (56) y se purificaron mediante proteína A. Las purezas de los anticuerpos eran >95% según el análisis de electroforesis en gel SDS.

Constantes de afinidad

Con el fin de determinar la afinidad de los anticuerpos para la adrenomedulina, se determinó la cinética de la unión de la adrenomedulina a anticuerpos inmovilizados, mediante resonancia de plasmón superficial libre de marcaje utilizando un sistema Biacore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Se llevó a cabo la inmovilización reversible de los anticuerpos utilizando un anticuerpo anti-Fc de ratón acoplado covalentemente a alta densidad con la superficie de un sensor CM5 siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de captura de anticuerpos de ratón; GE Healthcare) (22).

Procedimiento de marcaje (marcador): se mezclaron 100 µg (100 µl) de anticuerpo (1 mg/ml en PBS, pH 7,4) con 10 µl de éster NHS de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (57) y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. El CT-H marcado se purificó mediante HPLC de filtración en gel en Bio-Sil® SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). El anticuerpo marcado purificado se diluyó en 300 mmoles/l de fosfato de potasio, 100 mmoles/l de NaCl, 10 mmoles/l de Na-EDTA y 5 g/l de albúmina de suero bovino, pH 7,0. La concentración final era de aprox. 800.000 unidades relativas de luz (URL) de compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio mediante la utilización de un aparato AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

Fase sólida: se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con anticuerpo ((1,5 µg de anticuerpo/0,3 ml de NaCl 100 mmoles/l, TRIS/HCl 50 mmoles/l, pH 7,8). Tras el bloqueo con albúmina de suero bovino al 5%, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4, y se secaron bajo vacío.

Calibradores:

- Se diluyó linealmente ADM humana sintética (Bachem, Suiza) utilizando Tris/HCl 50 mM, NaCl 250 mM, Triton X-100 al 0,2%, BSA al 0,5%, 20 tab./l de proteasa (comprimidos de cóctel inhibidor de proteasas completo (Roche AG)), pH 7,8. Los calibradores se almacenaron a -20°C hasta que fueron utilizados.

Ejemplo 2

- Determinación de la combinación de anticuerpos que proporciona unas elevadas proporciones de señal/ruido

Ensayo inmunológico de ADM_h:

- Se introdujeron mediante pipeteado 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos, y tras añadir anticuerpo secundario marcado (200 µl), los tubos se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El marcador no unido se eliminó mediante lavado 5 veces (1 ml cada lavado) con solución de lavado (PBS 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%).

- Se midió la quimioluminiscencia unida a los tubos mediante la utilización de LB 953.

- Todos los anticuerpos se utilizaron en un ensayo inmunológico de tipo sándwich, tubo recubierto y anticuerpo marcado, y se combinaron en las variaciones mostradas en la Tabla 2, posteriormente:

- La incubación se llevó a cabo tal como se ha indicado para el ensayo inmunológico de ADM_h. Los resultados se proporcionan como proporciones de señal específica (con 10 ng/ml de ADM) / señal de fondo (muestra sin ADM).

Tabla 2:

Proporción señal/ruido	Marcador NT-ADM	Marcador MR-ADM	Marcador CT-ADM
NT-ADM	/	195	241
MR-ADM	204	/	904
CT-ADM	260	871	/

- Inesperadamente, se descubre que la combinación de MR-ADM y CT-ADM como combinación presenta la proporción señal/ruido más alta.

- A continuación, se utiliza dicha combinación de anticuerpos para investigaciones posteriores. Se utiliza MR-ADM como anticuerpo de la fase sólida y CT-ADM como el anticuerpo con marcaje. En la figura 1 se muestra la curva típica de dosis/señal. La sensibilidad analítica (media de 10 análisis, muestra sin ADM + 2SD) del ensayo fue de 2 pg de ADM/ml.

Ejemplo 3

- Estabilidad de la adrenomedulina humana:

- Se diluyó ADM en plasma-citrato humano (n=5, concentración final: 10 ng de ADM/ml) y se incubó a 24°C. En los puntos temporales seleccionados se congelaron alícuotas a -20°C. Inmediatamente después de descongelar las muestras, se cuantificó la ADM_h mediante la utilización del ensayo inmunológico de ADM_h indicado anteriormente.

Tabla 3: estabilidad de la ADM_h en plasma humano a 24°C

Tiempo (h)	Recuperación media de ADM (n=5)	Pérdida relativa de reactividad inmunitaria	% de pérdida de reactividad inmunitaria/h
0	100	/	/
2	99,2	0,8	0,4
4	96,4	3,6	0,8
8	88,2	11,8	1,5
			Media: 0,9%/h

- Inesperadamente, utilizando las combinaciones de anticuerpo MR-ADM y CT-ADM en un ensayo inmunológico de tipo sándwich, la estabilidad preanalítica del analito resultó ser elevada (pérdida media de reactividad inmunitaria de sólo 0,9%/h). En contraste, utilizando otros métodos de ensayo, se informó de una semivida en plasma de sólo 22 min. (Hinson, 2000). Debido a que el tiempo entre la extracción de la muestra y el análisis hospitalario rutinario fue inferior a 2 h, el método de detección de ADM utilizado resultó adecuado para el diagnóstico rutinario. Notablemente

no resultaron necesarios aditivos no rutinarios para que las muestras (como aprotinina, (20)) alcanzasen estabilidades de reactividad inmunitaria con ADM aceptables.

Ejemplo 4

Reproducibilidad de las preparaciones de calibrador

Se descubrió una elevada variabilidad de los resultados en la preparación de los calibradores para los ensayos de ADM (CV media de 8,5%; ver la Tabla 4). Esto podría deberse a una elevada adsorción de la ADM_h a las superficies plásticas y de vidrio (ver también (58)). Dicho efecto sólo se encontraba ligeramente reducido mediante la adición de detergentes (Triton X-100 al 1% como máximo o Tween-20 al 1% como máximo), proteína (BSA al 5% como máximo) y fuerza iónica elevada (NaCl 1 M como máximo) o combinaciones de los mismos. Inesperadamente, en el caso de que se añada un exceso de anticuerpo anti-ADM (10 µg/ml) al tampón de dilución del calibrador, la recuperación y reproducibilidad de las preparaciones de calibrador de ensayo de ADM mejoró sustancialmente hasta <1% del CV entre preparaciones (Tabla 4).

Afortunadamente la presencia de anticuerpos N-terminales no afectó a la señal de ADM generada mediante la combinación de los anticuerpos MR- y C-terminales (fig. 11).

Tabla 4:

	En presencia de anticuerpo de NT-ADM (10 µg/ml)	CV entre preparaciones (%)	Sin anticuerpo	CV entre preparaciones (%)
Calibrador				
100 ng/ml	3.453 s/n-r	0,9	2.842 s/n-r	2,8
10 ng/ml	1.946 s/n-r	0,8	1.050 s/n-r	7,9
1 ng/ml	179 s/n-r	1,1	77 s/n-r	14,8
		Media: 0,93		Media: 8,5
Variación entre preparaciones de los calibradores.				

Se prepararon calibradores del ensayo de ADM tal como se ha mencionado anteriormente con y sin 10 µg/ml de anticuerpo de NT-ADM. Se proporcionan los coeficientes de variación de 5 preparaciones independientes. Se midieron los calibradores utilizando el ensayo de ADM indicado anteriormente. s/n-r=proporción de señal a ruido.

Para todos los estudios siguientes, se utiliza un ensayo de ADM, basado en calibradores, preparado en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo de NT-ADM y 10 µg/ml de anticuerpo de NT-ADM como complemento en el tampón del marcador.

Ejemplo 5

Sensibilidad

El objetivo de la sensibilidad del ensayo era cubrir por completo las concentraciones de ADM de los sujetos sanos.

Concentración de ADM en sujetos sanos:

Se midieron sujetos sanos (n=100, edad media: 56 años) utilizando el ensayo de ADM. El valor de la mediana era de 24,7 pg/ml; el valor mínimo era de 11 pg/ml y el percentil 99 era de 43 pg/ml. Debido a que la sensibilidad del ensayo era de 2 pg/ml, el 100% de los sujetos sanos eran detectables utilizando el ensayo de ADN descrito (ver la fig. 2).

Ejemplo 6

Estudio clínico

Un total de 101 pacientes de urgencias que satisfacían la definición de sepsis (59) fueron posteriormente hospitalizados (media de 5 días de hospitalización) y recibieron el tratamiento estándar de cuidados. Se generó plasma-EDTA desde el día 1 (presentación en el servicio de urgencias) y una muestra cada día durante la estancia hospitalaria. El tiempo hasta la congelación de las muestras para la posterior medición de la ADM fue inferior a 4 h.

En la Tabla 5 se resumen las características de los pacientes.

Tabla 5:

Variable	todos (n=101)	muerter hospitalarias (n=27)	Datos de alta (n=74)	Valor de p
<u>Demografía</u>				
Sexo - masculino	60 (60)	13 (48)	47 (64)	0,163
Edad - mediana [RIC]	78 [72-72]	77 [71,25-83]	80 [75-84,5]	0,142
<u>Variables del examen</u>				
PS sistólica (mmHg) - mediana [RIC]	115 [100-100]	120 [106,25-138,75]	105 [80-120]	0,001
PS diastólica (mmHg) - mediana [RIC]	65 [60-60]	65 [60-85]	60 [50-70]	0,002
FC - mediana [RIC]	100 [94-94]	100 [94-114,75]	100 [93,5-107,5]	0,407
RR - mediana [RIC]	24 [22-22]	24 [22-28]	26 [24-28]	0,069
PAM (mmHg) - mediana [RIC]	83,3 [74-74]	83,3 [77,62-100,75]	81,6 [63,5-89]	0,026
<u>Enfermedades concomitantes</u>				
Cardiovascular - sí	26 (25,7)	9 (33,3)	17 (23)	0,311
Hipertensión - sí	47 (46,5)	13 (48,1)	34 (45,9)	1,000
Diabetes - sí	35 (34,7)	9 (33,3)	26 (35,1)	1,000
Cáncer - sí	13 (12,9)	3 (11,1)	10 (13,5)	1,000
<u>Variables de laboratorio rutinarias</u>				
Cultivo sanguíneo - sí	31 (31)	5(19)	26 (35)	0,246
negativo	15(16,3)	2(8)	13 (19,4)	
positivo	16(17,4)	3(12)	13 (19,4)	
Eliminación de la creatinina (ml/min) - mediana [RIC]	48 [23,25-23,25]	56 [29,25-80]	31,5 [14,75-66]	0,043
Creatinina - mediana [RIC]	1,3 [0,9-0,9]	1,25 [0,9-2,08]	1,8 [1-3,15]	0,080
UREA - mediana [RIC]	36 [21-21]	31,5 [20-53,25]	51 [42-87]	0,004
GCS - mediana [RIC]	15 [10-10]	15 [12,5-15]	8 [8-11]	<0,001
Pcr - mediana [RIC]	16 [6,6-6,6]	14,5 [6,7-23,7]	17,35 [6,6-28,05]	0,846
Gluco - mediana [RIC]	113,5 [94,5-94,5]	110 [95,5-144]	128 [94-160,5]	0,400
biliru - mediana [RIC]	0,9 [0,71-0,71]	0,9 [0,7-1,03]	0,91 [0,77-1,18]	0,534
GR - mediana [RIC]	3,8 [3,3-3,3]	3,8 [3,2-4,3]	3,7 [3,4-4,2]	0,684
GB - mediana [RIC]	12700 [6774-6774]	13100 [8115-17565]	11920 [25,55-18790]	0,343
PLT - mediana [RIC]	213 [150-150]	217 [154,75-301]	185 [130-236,5]	0,113
HCT - mediana [RIC]	32 [28-28]	31,5 [28-37]	34 [31,25-39,5]	0,149
Leuco/Neutr (%) - mediana [RIC]	87 [80-80]	86 [78,25-89,95]	91 [87-93,05]	0,001
HB - mediana [RIC]	10,4 [9,47-9,47]	10,15 [9,3-12,4]	10,85 [9,9-12,67]	0,220
Na - mediana [RIC]	137 [134-134]	137 [133-141]	139 [134-144,5]	0,204
K - mediana [RIC]	3,9 [3,5-3,5]	3,9 [3,6-4,3]	3,9 [3,3-5,1]	0,982
INR - mediana [RIC]	1,19 [1,1-1,1]	1,19 [1,1-1,4]	1,18 [1,04-1,36]	0,731
TC - mediana [RIC]	38,4 [36-36]	38,5 [38,12-38,7]	36 [35,55-38,5]	<0,001
SAO2 - mediana [RIC]	94 [90-90]	95 [90,25-97]	93 [88,5-95,5]	0,119

pH - mediana [RIC]	7,45 [7,38-7,38]	7,46 [7,4-7,5]	7,4 [7,24-7,4]	<0,001
PO2 - mediana [RIC]	67 [56-56]	66,5 [56-78]	67 [56,5-79,5]	0,806
PCO2 - mediana [RIC]	36 [32-32]	37,5 [33-43,75]	34 [30-41]	0,245
Lact - mediana [RIC]	1,5 [1-1]	1,3 [0,83-1,9]	2,5 [1,4-4,15]	<0,001
Bic - mediana [RIC]	23,5 [21-21]	24,25 [21,43-28]	21 [17,35-23,25]	0,001
FiO2 (%) - mediana [RIC]	21 [21-21]	21 [21-23,25]	24 [21-45]	<0,001
<u>otros</u>				
Disfunción orgánica aguda - sí	39 (43,3)	16 (64)	23(35,4)	0,021
Puntuación Apache (%) - mediana [RIC]	19 [12,5-12,5]	14,65 [12,12-20,38]	32 [20-39]	<0,001
Días hospitalizado - mediana [RIC]	5 [2-2]	6 [4-7]	2 [1-6]	0,003
<u>Tratamiento en la línea base</u>				
Diuresis (cc) - mediana [RIC]	900 [600-600]	1000 [700-1200]	450 [200-1025]	<0,001
Esteroides - sí	16(15,8)	4(14,8)	12(16,2)	1,000
Vasopresores - sí	18(17,8)	13 (48,1)	5 (6,8)	<0,001
Antibióticos - sí	101(100)	27 (100)	74 (100)	1,000
Terapia de fluidos - sí	101(100)	27 (100)	74 (100)	1,000
<u>Nuevo biomarcador</u>				
ADM (pg/mL) - mediana [RIC]	53,8 [37,4-94,0]	93,9 [48,7-241]	50,1 [32,2-77,8]	<0,001

El 26,7% de todos los pacientes murieron durante la estancia hospitalaria y se contaron como no respondedores al tratamiento. El 73,3% de todos los pacientes sobrevivieron a la sepsis y se contaron como respondedores al tratamiento.

5 El 66% de todos los pacientes que presentaron con sepsis presentaban un valor de ADN no normal >43 pg/ml (percentil 99), indicando que ADM no es un marcador de la infección.

Resultados del estudio clínico

10 La ADM inicial es altamente pronóstica.

Se correlacionó el valor inicial de ADM con la mortalidad hospitalaria y compararon la ADM con la puntuación de sepsis APACHE 2 (ver (60)). La ADM es altamente pronóstica del resultado de la sepsis (ver la fig. 3) y comparable a la puntuación APACHE 2. Se añade información significativa en el caso de que se combine ADM y APACHE 2 (fig. 4).

ADN en el seguimiento del tratamiento.

20 Los pacientes se trataron basándose en el tratamiento estándar de cuidados (Tabla 5). El tiempo medio de hospitalización fue de 5 días. Se midió la ADM cada día en el hospital (día 1=admisión) y se correlacionó con la mortalidad hospitalaria (Tabla 6). La ADM cambió durante la estancia hospitalaria y el cambio durante el tiempo mejoró el valor pronóstico en 52% desde una Chi² inicial de 19,2 a 29,2 el día 5.

25 Utilizando un modelo simple de corte en 70 pg/ml de ADM se observó un riesgo de muerte de 68% para los pacientes con concentraciones iniciales de ADM >70 pg/ml y que permanecieron durante toda la estancia hospitalaria con concentraciones >70 pg/ml (no respondedores al tratamiento). Los pacientes que presentaron todo el tiempo un valor de ADM <70 pg/ml o que se desarrolló de >70 pg/ml a <70 pg/ml presentaron una mortalidad de sólo 11% (bien tratados/respondedor al tratamiento) y los pacientes que presentaban valores de ADM >70 pg/ml y que redujeron su concentración de ADN durante el tratamiento hospitalario a valores <70 pg/ml presentaron una mortalidad de 0%. Ningún paciente cambió de concentraciones <70 pg/ml a >70 pg/ml durante el tratamiento hospitalario. El tiempo medio necesario para generar información de respondedor/no respondedor para todos los pacientes fue de aproximadamente 1 día. Los pacientes de >70 pg/ml que respondieron al tratamiento durante la estancia hospitalaria necesitaron aproximadamente 2 días para indicar el éxito del tratamiento a través de la ADM.

35 Tabla 6

	Pacientes con todos los días >70 pg/ml	Pacientes con todos los días <70 pg/ml	Pacientes que cambiaron de >70 pg/ml a <70 pg/ml
n	28/101 (27,7%)	73/101 (72,3%)	15/73 (20,5%)
Mortalidad	68%	11%	0%
Promedio de días tras la	1 día	1,2 días	2,2 días

hospitalización de ADM>70 pg/ml a ADM<70 pg/ml o ningún cambio			
---	--	--	--

Literatura

- 5 (1) Kitamura, K., et al., "Adrenomedullin: A Novel Hypotensive Peptide Isolated From Human Pheochromocytoma", Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 192 (2), pp. 553-560 (1993).
- (2) Editorial, Takahashi, K., "Adrenomedullin: from a pheochromocytoma to the eyes", Peptides, Vol. 22, p. 1691 (2001).
- 10 (3) Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", Peptides, Vol. 22, pp. 1693-1711 (2001).
- (4) Hinson, et al., "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", Endocrine Reviews, Vol. 21(2), pp. 138-167 (2000).
- 15 (5) Kitamura, K., et al., "The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 244(2), pp. 551-555 (1998). Abstract Only.
- 20 (6) Pio, R., et al., "Complement Factor H is a Serum-binding Protein for Adrenomedullin, and the Resulting Complex Modulates the Bioactivities of Both Partners", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276(15), pp. 12292-12300 (2001).
- (7) Kuwasako, K., et al., "Purification and characterization of PAMP-12 (PAMP-20) in porcine adrenal medulla as a major endogenous biologically active peptide", FEBS Lett, Vol. 414(1), pp. 105-110 (1997). Abstract Only.
- 25 (8) Kuwasaki, K., et al., "Increased plasma proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in patients with essential hypertension", Ann. Clin. Biochem., Vol. 36 (Pt. 5), pp. 622-628 (1999). Abstract Only.
- (9) Tsuruda, T., et al., "Secretion of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells", Life Sci., Vol. 69(2), pp. 239-245 (2001). Abstract Only.
- 30 (10) EP 0 622 458 A2
- (11) Hirata, et al., "Increased Circulating Adrenomedullin, a Novel Vasodilatory Peptide, in Sepsis", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 81(4), pp. 1449-1453 (1996).
- 35 (12) Ehlenz, K., et al., "High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: Correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin", Exp Clin Endocrinol Diabetes, Vol. 105, pp. 156-162 (1997).
- 40 (13) Tomoda, Y., et al., "regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells", Peptides, Vol. 22, pp. 1783-1794 (2001).
- (14) Ueda, S., et al., "Increased Plasma Levels of Adrenomedullin in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome", Am. J. Respir. Crit. Care Med., Vol. 160, pp. 132-136(1999).
- 45 (15) Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", Peptides, Vol. 22, pp. 1835-1840 (2001).
- (16) Wang 1998
- 50 (17) Wang 1998 Arch Surg, Itoh, 2007
- (18) Parlapiano, C., et al., "Adrenomedullin assay and its clinical significance", European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 1999; 3:53-61
- 55 (19) Hirata 2007
- (20) Ohta 1999
- 60 (21) Kitamura 1994
- (22) Lorenz et al., "Functional Antibodies Targeting IsaA of Staphylococcus aureus Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy"; Antimicrob Agents Chemother. 2011 January; 55(1): 165-173.

- (23) The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3rd ed. (May 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb;10(1):4-10. PMID: 16376134
- 5 (24) Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4th ed., executive editor, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol.15, p. 518-562.
- (25) Schuetz P, et al. PCT follow up measurement for monitoring antibiotic treatment success; 8Cochrane Database Syst Rev. 2012 Sep 12;9:CD007498. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections.
- 10 (26) Christ-Crain M, et al. "Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial" Am J Respir Crit Care Med. 2006 Jul 1;174(1):84-93. Epub 2006 Apr 7.
- 15 (27) Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105,1987;
- (28) Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883, 1988;
- (29) Bird et al., Science 242:423-426, 1988;
- 20 (30) Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2nd ed., 1984;
- (31) Hunkapiller and Hood, Nature 323:15-16,1986)
- 25 (32) E. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983
- (33) Patente U.S. nº. 5.807.715.
- 30 (34) Patente U.S. nº 5.585.089.
- (35) Dower et al., publicación de patente PCT nº WO91/17271;
- (36) McCafferty et al., publicación de patente PCT nº WO921001047;
- 35 (37) Winter, publicación de patente PCT nº WO92/20791
- (38) Lonberg et al., publicación de patente PCT nº WO93/12227; and
- 40 (39) Kucherlapati, publicación de patente PCT nº WO91/10741,
- (40) US 2010/0028995
- (41) EP 1266 025;
- 45 (42) WO 2011/154420
- (43) WO 2011/073214
- 50 (44) US 2004/0023334
- (45) EP 2231860
- (46) WO 2010/060748
- 55 (47) EP 2314308
- (48) WO 2011/023685
- 60 (49) WO 2005/040229
- (50) EP 1941867
- 65 (51) Lane, R.D. (1985). A short-duration polyethylene glycol fiasion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. J. Immunol. Meth. 81: 223-228;

(52) Ziegler, B. et al. (1996) Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies, *Horm. Metab. Res.* 28: 11-15).

5 (53) Hust, M., et al 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of Biotechnology* 152, 159-170;

(54) Schütte, M., et al. 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 4, e6625)

10 (55) Almagro JC, Fransson J., 2008. Humanization of antibodies. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1619-33.

(56) Marx et al., *Monoclonal Antibody Production*, ATLA 25, 121, 1997

15 (57) EP 0 353 971

(58) Lewis, L., et al., "Adrenomedullin (I-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage", *Clinical Chemistry*, Vol. 44(3), pp. 571-577 (1998).

20 (59) *Crit Care Med.* 2008 Jan; 36(1):296-327.

(60) Knaus *et al.*, 1985, 2001.

Descripción de las figuras

25 Figura 1: representa una curva típica de dosis-respuesta de ADM_h utilizando MR-ADM como anticuerpo de fase sólida y CT-ADM como anticuerpo marcado.

30 Figura 2: se midieron sujetos sanos (n=100, edad media: 56 años) utilizando el ensayo de ADM. El valor de la mediana era de 24,7 pg/ml, el valor mínimo era de 11 pg/ml y el percentil 99 era de 43 pg/ml. Debido a que la sensibilidad del ensayo era de 2 pg/ml, el 100% de todos los sujetos sanos era detectable utilizando el ensayo de ADM descrito.

35 Figura 3: predicción de la mortalidad hospitalaria. Resultados de la regresión logística.

Figura 4: predicción de la mortalidad hospitalaria. ADM era independiente de Apache y proporciona información pronóstica adicional.

40 Figuras 5 y 10: cinética de la ADM de pacientes individuales.

Figuras 5 y 6: supervivientes, la ADM era <70 pg/ml en la presentación en urgencias (día 1) y durante la estancia hospitalaria. La ADM indicaba un buen tratamiento del paciente.

45 Figuras 7 y 8: supervivientes, la ADM era superior a 70 pg/ml en la presentación en urgencias (día 1) y se redujo durante el tratamiento hospitalario hasta valores inferiores a 70 pg/ml (respondedores al tratamiento).

Figuras 9 y 10: pacientes fallecidos, la ADM era superior a 70 pg/ml en la presentación en urgencias (día 1) y no se redujo a valores inferiores a 70 pg/ml durante el tratamiento hospitalario (no respondedores al tratamiento).

50 Figura 11: ensayo de ADM en presencia y en ausencia de anticuerpos N-terminales

Se llevó a cabo el ensayo de ADM tal como se ha indicado anteriormente. A) Curva de referencia, B) en presencia de anticuerpo NT-ADM (10 µg/ml, 3,33 µg/ensayo). La adición de anticuerpo NT-ADM no influyó sobre el ensayo de ADM.

Secuencias

SEC ID nº 1: ADM 21-52

60 CTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-CONH₂

SEC ID nº 2: ADM 21-52-Gly

CTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGYG

65 SEC ID nº 3: PreProADM

MKLVSV ALMYLGSLAFLGADTARLDVASEFRKKWNKWALSRGKRELRMSSSYPTGLA
DVKAGPAQTLIRPQDMKGASRSPEDSSPDAARIRVKRYRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCT
VQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGYGRRRRRSLPEAGPGRTLVS SKPQAHGAPA
PPSGSAPHFL

SEC ID nº 4: ADM 1-52

5

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-CONH₂

SEC ID nº 5: ADM 1-52-Gly

10

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGYG

SEC ID nº 6: ADM 21-32

CTVQKLAHQIYQ

15

SEC ID nº 7: ADM 42-52

APRSKISPQGY

20

SEC ID nº 8: ADM 1-16-Gly (aminoácido)

YRQSMNMFQGLRSFGC

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes que se sospecha que presentan sepsis en el que la concentración de adrenomedulina madura (ADM) (1-52-amida) y/o ADM 1-52-Gly madura en una muestra de líquido corporal de dicho paciente séptico se determina utilizando un ensayo que comprende dos agentes de unión que se seleccionan de entre el grupo que comprende un anticuerpo antiadrenomedulina y un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se unen a la ADM y que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina (21-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras, es decir, aminoácido 21-52-amida (SEC ID nº 1) o aminoácido 21-52-Gly (SEC ID nº 2), respectivamente, en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.
2. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según la reivindicación 1, en el que uno de dichos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM (1-52-amida) madura y/o la ADM 1-52-Gly madura (SEC ID nº 4) y en el que dicho segundo de estos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM (1-52-amida) madura y/o la ADM 1-52-Gly madura (SEC ID nº 5).
3. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según la reivindicación 1 o 2, en el que la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo puede cuantificar la ADM de los sujetos sanos y es <10 pg/ml, preferentemente <40 pg/ml y más preferentemente <70 pg/ml.
4. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho agente de unión presenta una afinidad de unión a la ADM (1-52-amida) madura y/o la ADM 1-52-Gly madura de por lo menos 10^7 M^{-1} .
5. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo automatizado completamente.
6. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que se marca por lo menos uno de dichos dos agentes de unión con el fin de ser detectado.
7. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se une a una fase sólida.
8. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según la reivindicación 6 en el que dicho marcador se selecciona de entre el grupo que comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador fluorescente y un marcador de yodo radioactivo.
9. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que la concentración de la ADM (1-52-amida) madura y/o ADM 1-52-Gly madura medida en la muestra se encuentra en el intervalo entre 10 y 500 pg/ml.
10. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que se aplica un umbral por el que un valor superior al umbral es indicativo de un paciente que no responde o responde mal a la terapia y mientras que un valor inferior a dicho umbral es indicativo de un paciente que responde a la terapia.
11. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que se aplica un umbral de 60 a 80 pg/ml, preferentemente 70 pg/ml.
12. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que comprende plasma citrato, plasma heparina, plasma EDTA y sangre completa humanos.
13. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según la reivindicación 12 en el que dicha muestra tomada se mide directamente sin ninguna preparación de la muestra adicional.
14. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que dicho método se lleva a cabo en un dispositivo automatizado completamente.
15. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que se determina la ADM (1-52-amida) madura y/o la ADM 1-52-Gly madura en por lo menos dos muestras, en el que dichas muestras se toman en diferentes puntos temporales de dichos pacientes sépticos.
16. Método *in vitro* para el seguimiento de la terapia en pacientes sépticos según cualquiera de las reivindicaciones 1

a 15 en el que el volumen de muestra medido es inferior o igual a 50 µl.

17. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra que comprende dos agentes de unión que se seleccionan de entre el grupo que comprende un anticuerpo antiadrenomedulina y un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se unen a ADM y que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras, es decir aminoácido 21-52-amida SEC ID nº 1 o aminoácido 21-52-Gly de la adrenomedulina madura SEC ID nº 2, respectivamente, en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos y en el que dicho ensayo no es un ensayo manual de tipo sándwich de tubo recubierto-éster de acridinio.

18. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra que comprende dos agentes de unión que se seleccionan de entre el grupo que comprende un anticuerpo antiadrenomedulina y un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se unen a ADM y que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras, es decir aminoácido 21-52-amida (SEC ID nº 1) o aminoácido 21-52-Gly de la adrenomedulina madura (SEC ID nº 2), respectivamente, en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos y en el que dicho ensayo es un ensayo manual de tipo sándwich de tubo recubierto-éster de acridinio y en el que uno de dichos agentes de unión es un anticuerpo que se une a la SEC ID nº 6 CTQVQKLAHQIYQ, y en el que el segundo de dichos agentes de unión es un anticuerpo que se une a la SEC ID nº 7 APRSKISPQGY en la que el ácido carboxílico es sustituido por un grupo amida (APRSKISPQGY-CO-NH₂).

19. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según la reivindicación 17, en el que uno de dichos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM 1-52-Gly madura (SEC ID nº 4) y en el que dicho segundo de estos agentes de unión se une a una región comprendida dentro de la secuencia siguiente de la ADM (1-52-amida) madura y/o la ADM 1-52-Gly madura (SEC ID nº 5).

20. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo puede cuantificar la ADM de los sujetos sanos y es <10 pg/ml, preferentemente <40 pg/ml y más preferentemente <70 pg/ml.

21. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que dicho agente de unión presenta una afinidad de unión para la adrenomedulina de por lo menos 10^7 M^{-1} .

22. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo automatizado completamente.

23. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que por lo menos uno de dichos agentes de unión se marca con el fin de ser detectado.

24. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se une a una fase sólida.

25. Ensayo para determinar la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras en una muestra según la reivindicación 23, en el que dicho marcador se selecciona de entre el grupo que comprende marcador quimioluminiscente, marcador enzimático, marcador fluorescente, marcador de yodo radioactivo.

26. Kit que comprende un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en el que los componentes de dicho ensayo pueden estar comprendidos en uno o más recipientes.

27. Método de calibración de un ensayo según la reivindicación 17, en el que se utiliza un agente de unión que se une a una región de por lo menos 5 aminoácidos dentro de los aminoácidos 1-16 (SEC ID nº 8) de la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras, en el que dicho agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo anti-ADM y un fragmento de anticuerpo anti-ADM.

28. Método de calibración de un ensayo según la reivindicación 27, en el que el agente de unión reconoce y se une al extremo N-terminal de la adrenomedulina (1-52-amida) y/o la adrenomedulina-Gly maduras, en el que dicho agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo anti-ADM y un fragmento de anticuerpo anti-ADM.

Fig. 1:

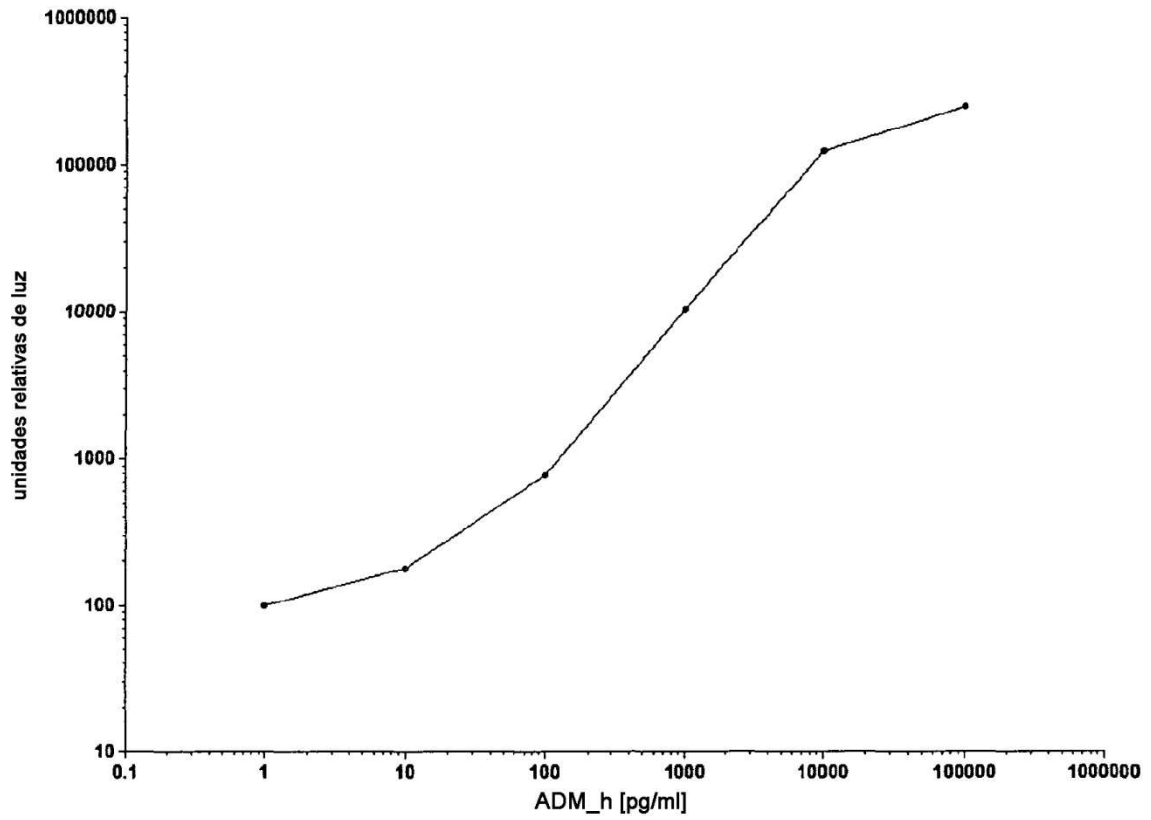


Fig. 2:

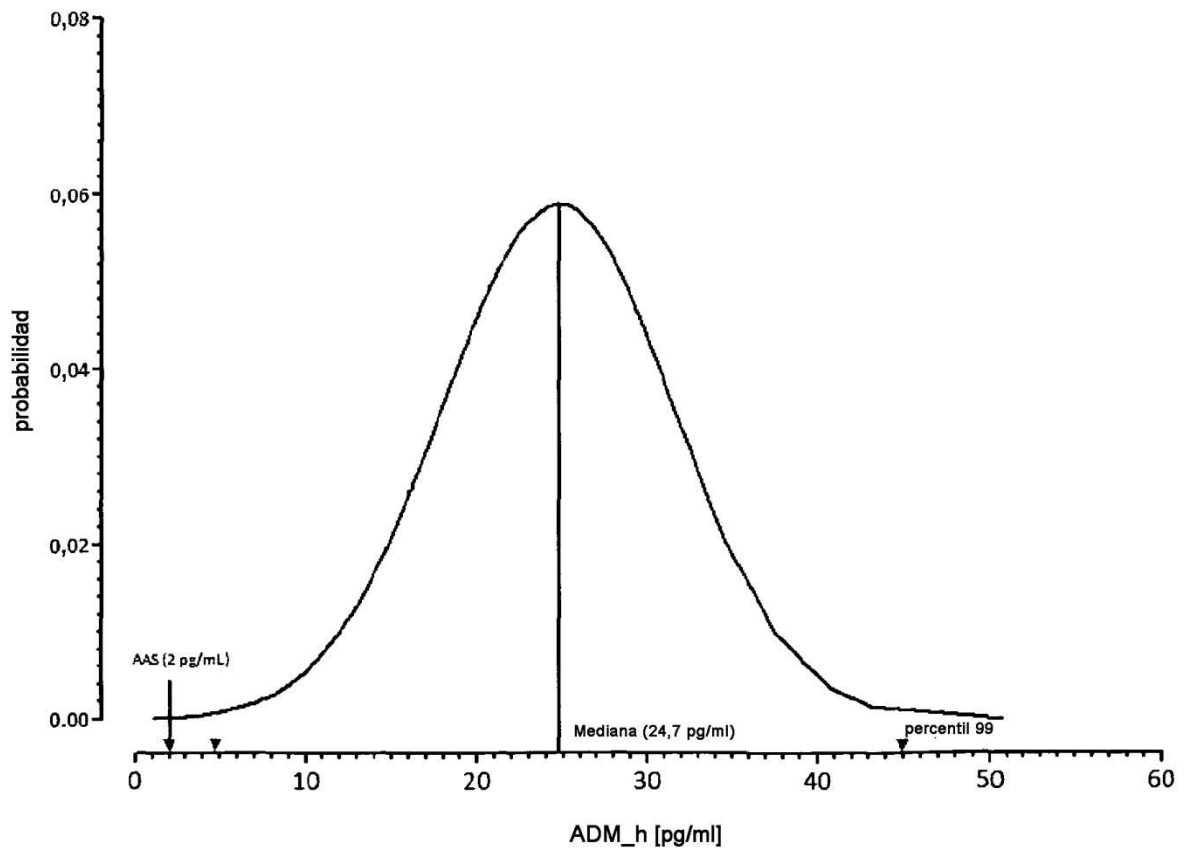


Fig. 3:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

□ Resultados de la regresión logística:

Modelo	N	Sucesos	Chi2 - modelo	d.f.	LR valor de p	índice C [IC al 95%]
ADM_h	101	27	19,23	1	0,00001	0,737 [0,622,0,852]
Apache	101	27	19,98	1	0,00001	0,783 [0,681,0,886]

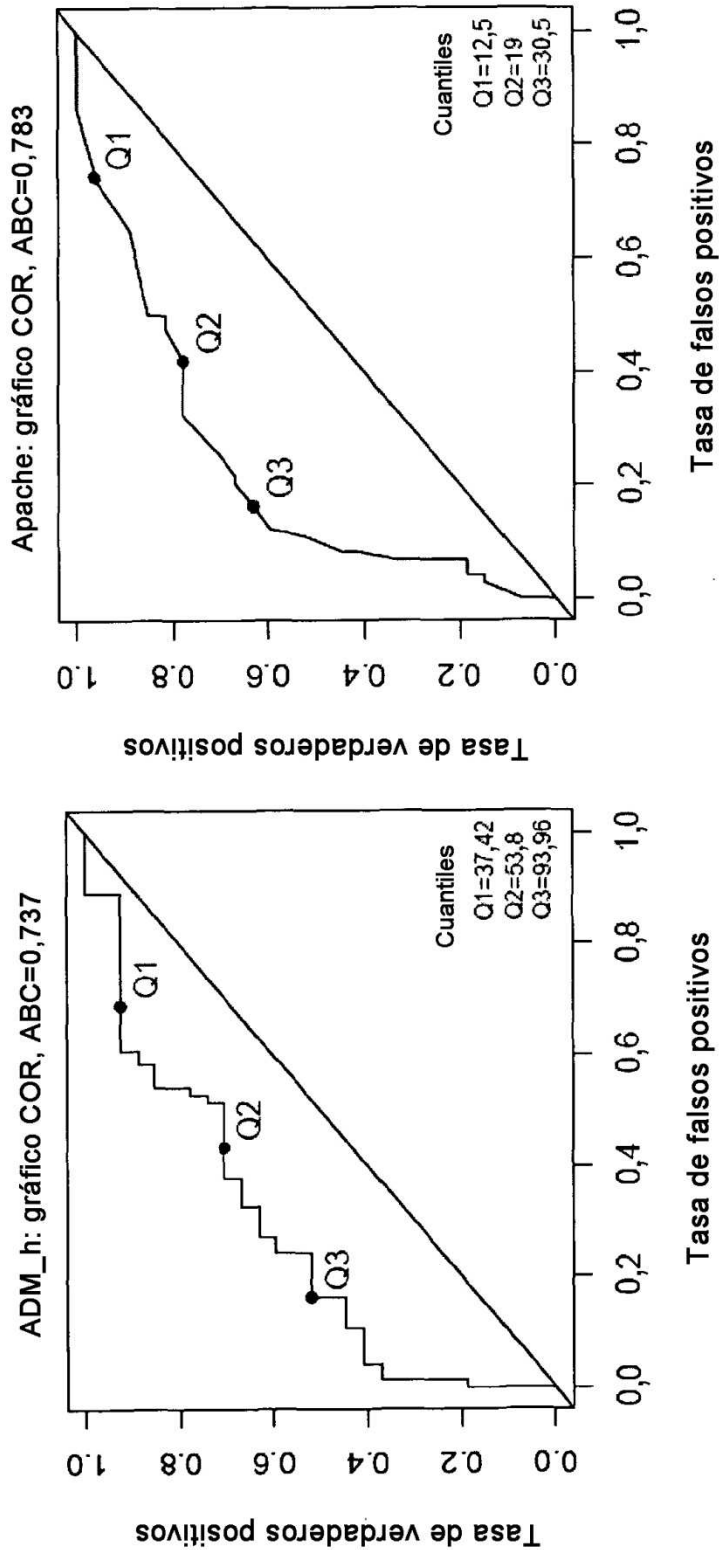


Fig. 4:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

- ADM es independiente de Apache y proporciona información pronóstica adicional:

	LR.	χ^2	d.f.	valor de p
adición de Apache (Apache) a ADM_h	1	0,0075		
adición de ADM_h (ADM_h) a Apache	1	0,0115		

- ABC(ADM + APACHE): 0,799
(vs. 0,783 para APACHE solo)
- Chi²: 26,4 (vs. 20,0 para APACHE)

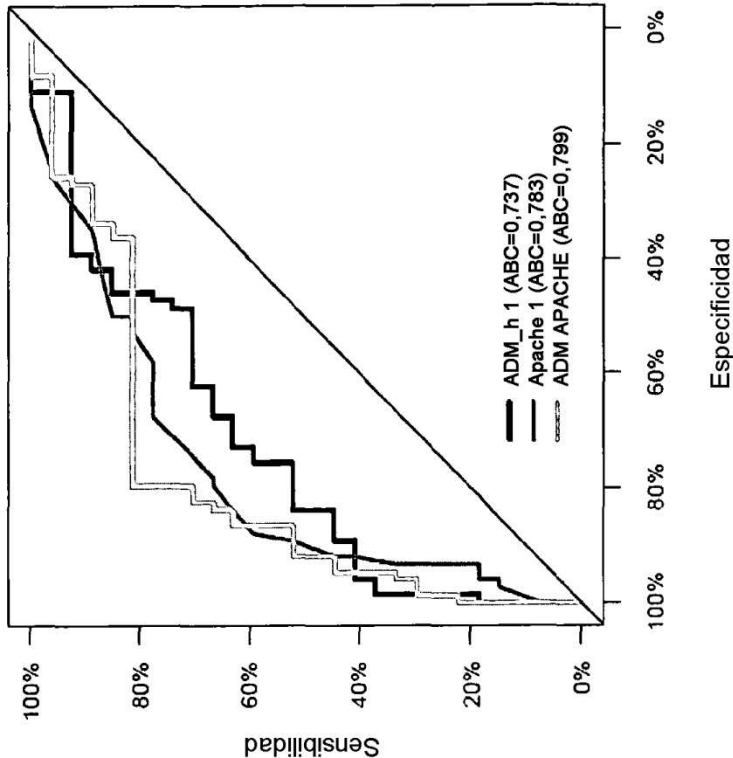


Fig. 5:

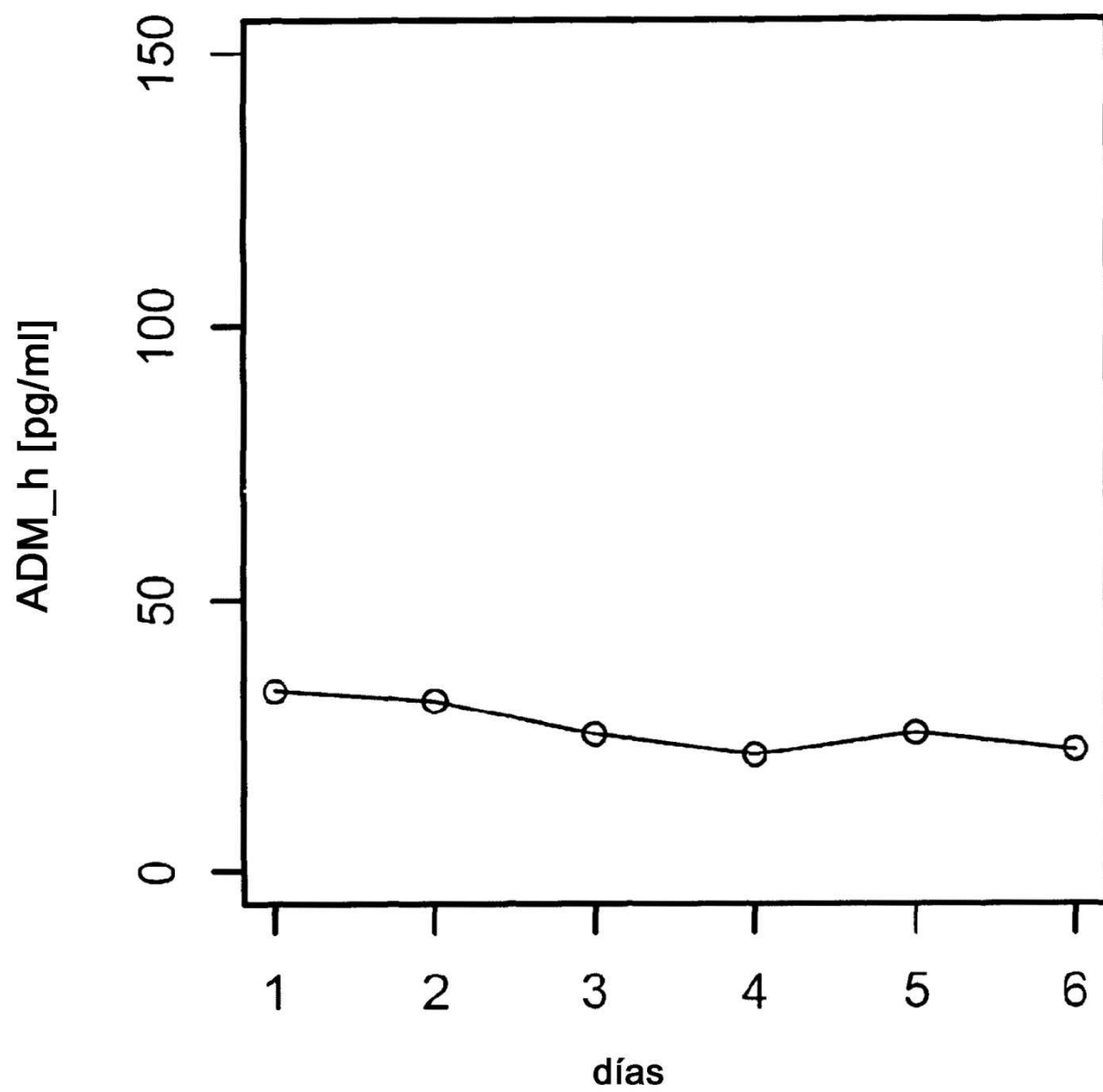


Fig. 6:

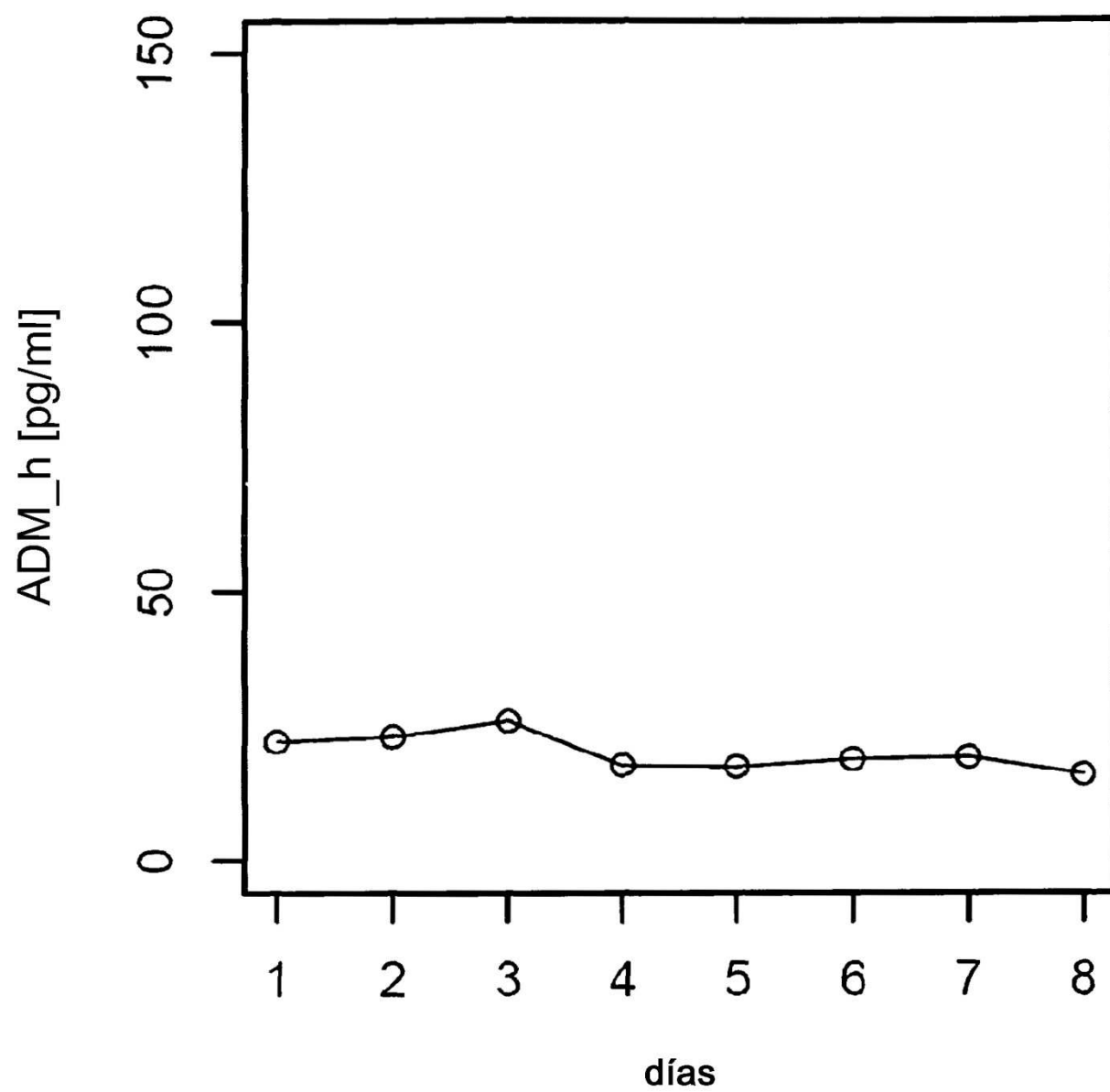


Fig. 7:

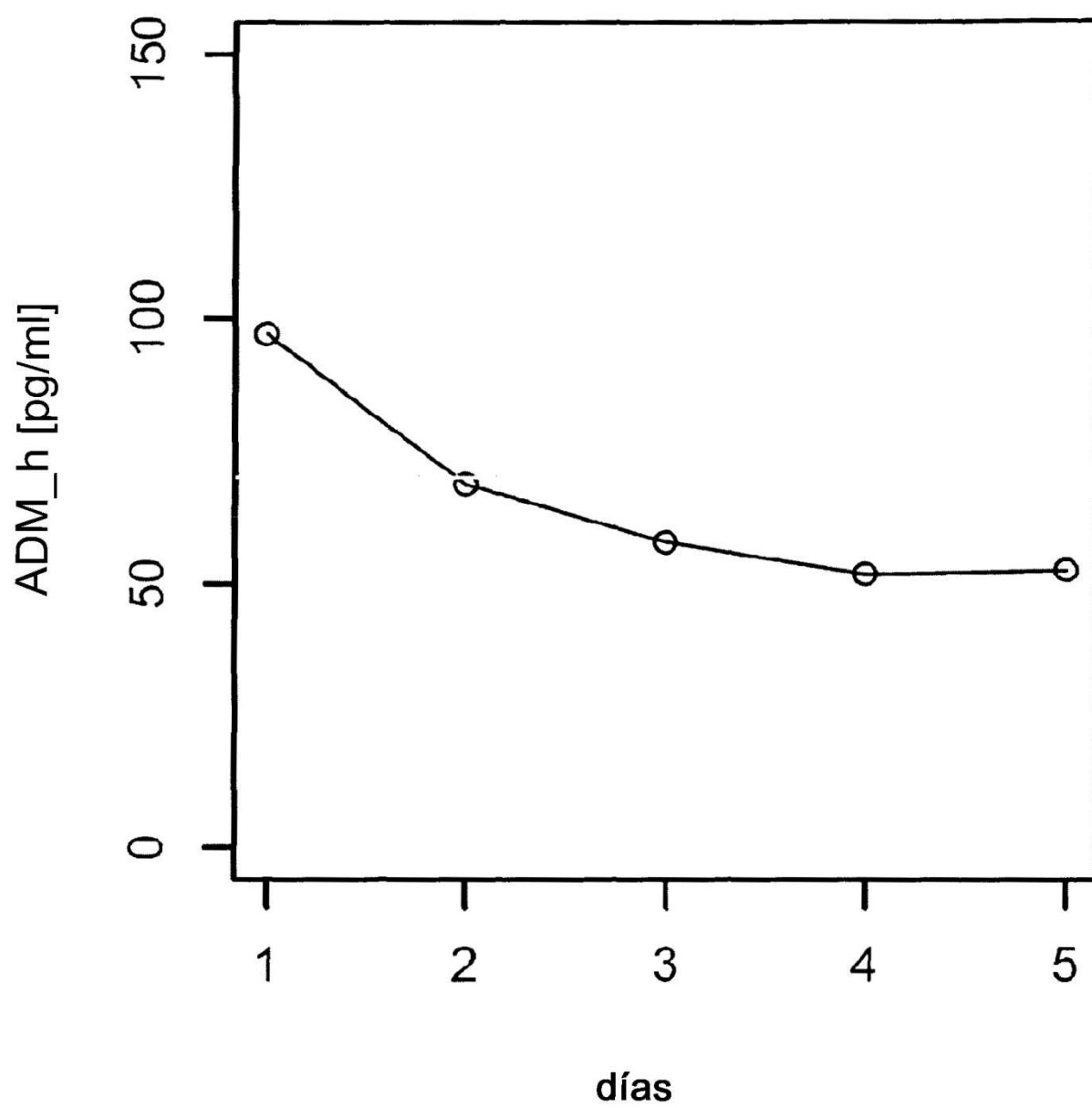


Fig. 8:

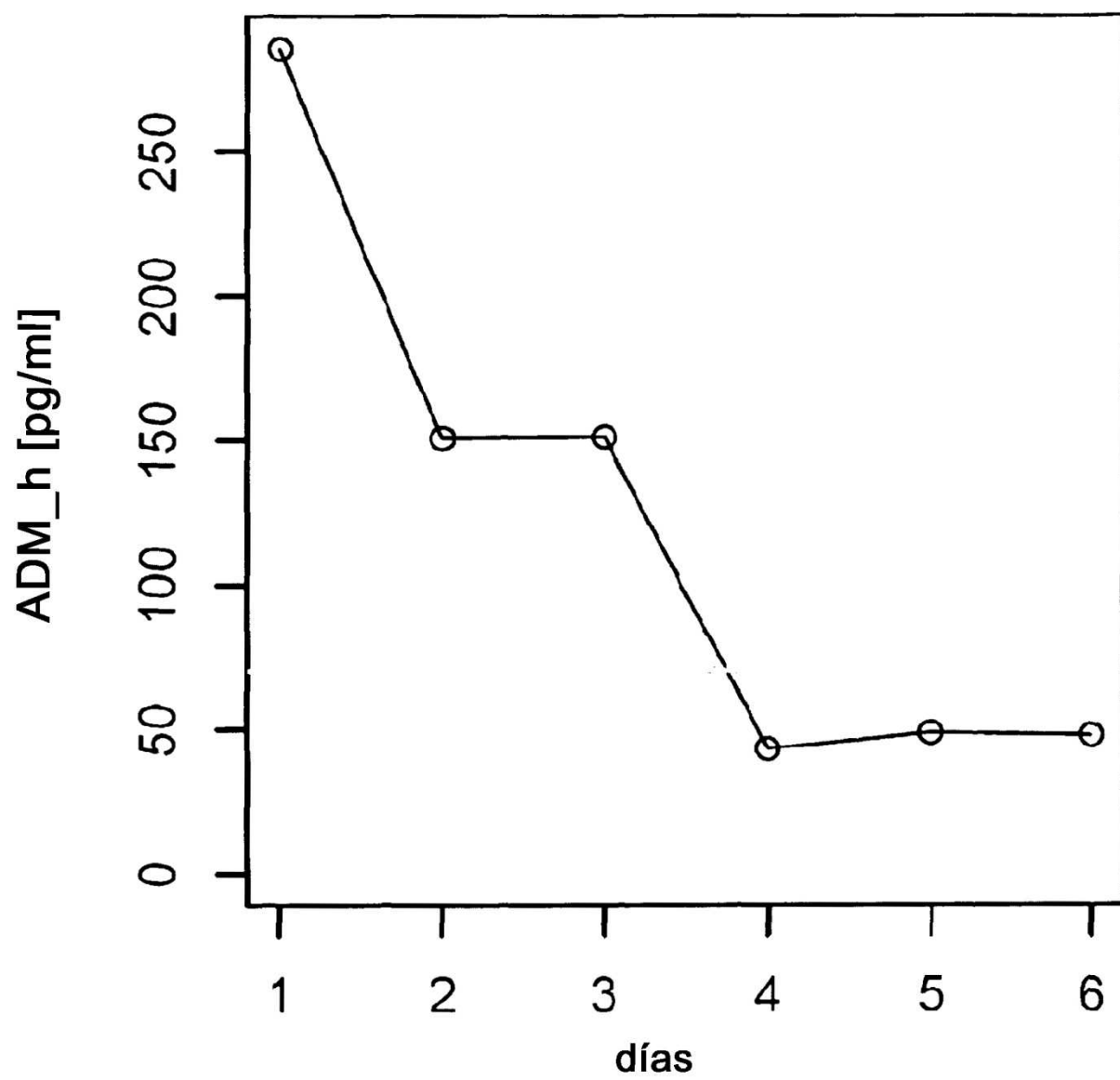


Fig. 9:

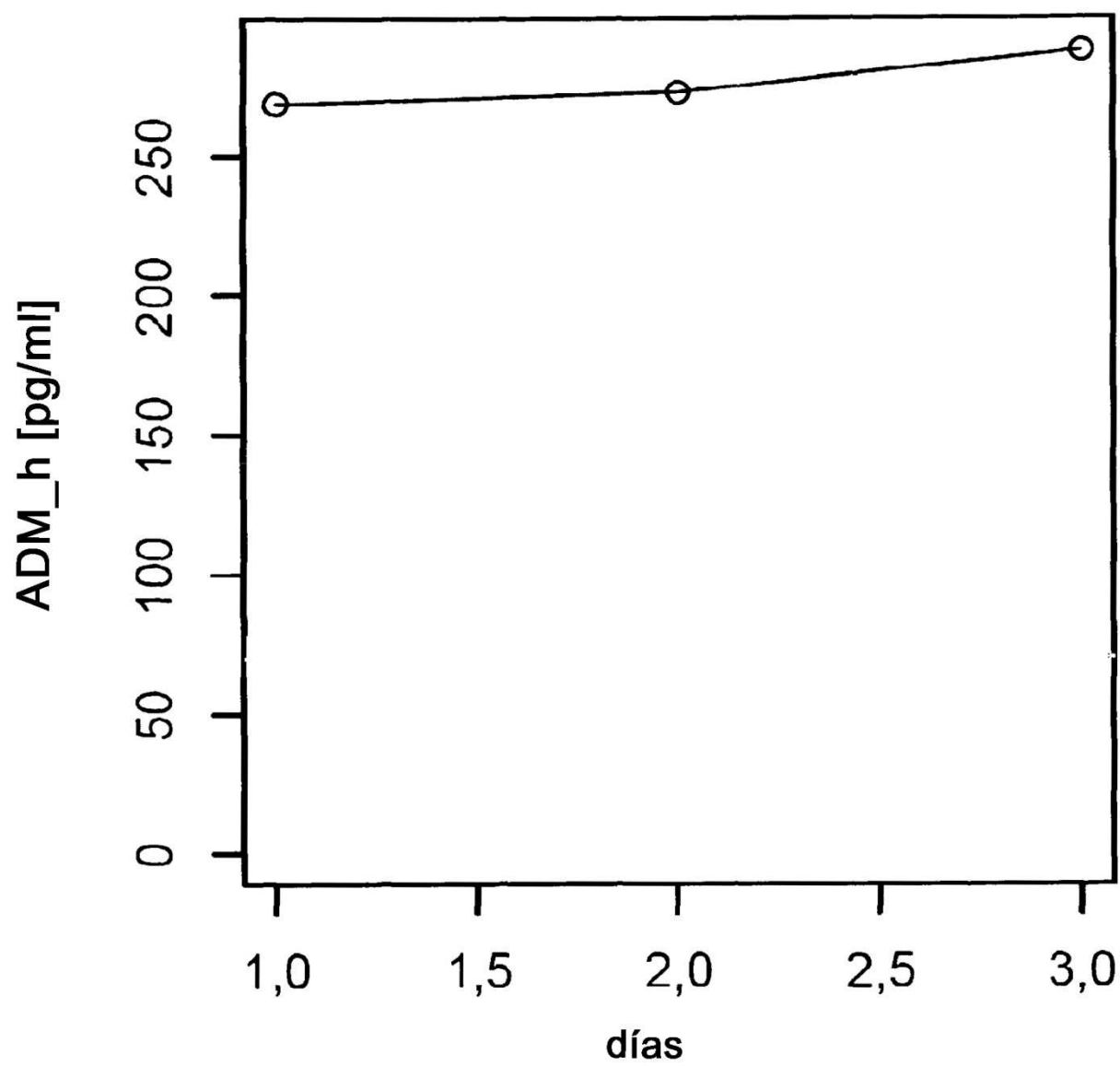


Fig. 10:

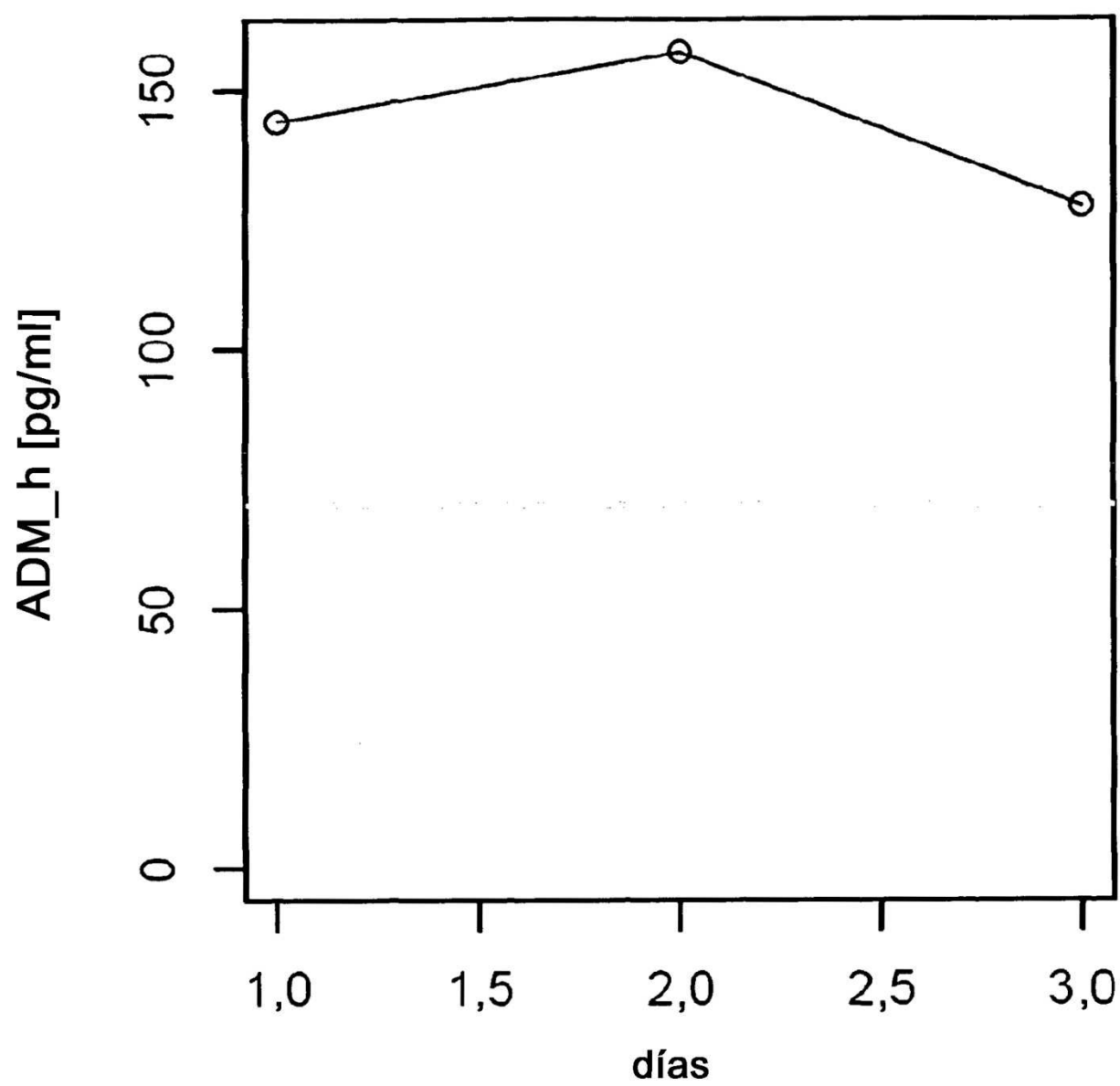


Fig. 11:

