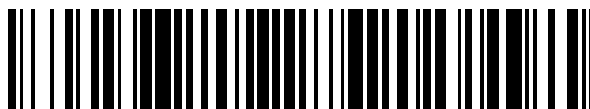


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 102**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2011** **PCT/EP2011/056763**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011** **WO11135035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011** **E 11716561 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017** **EP 2563811**

54 Título: **Inmunoensayo para cromogranina A, anticuerpos y kit**

30 Prioridad:

28.04.2010 EP 10161375

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

EURO-DIAGNOSTICA AB (100.0%)
P.O. Box 50117
202 11 Malmö, SE

72 Inventor/es:

STRIDSBERG, MATS y
SOMMARIN, YNGVE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 102 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

Inmunoensayo para cromogranina A, anticuerpos y kit

- 5 La presente invención se refiere a un método para la determinación de la cromogranina A (CGA). La descripción proporciona anticuerpos monoclonales contra la CGA e inmunorreactivos basados en los mismos que pueden usarse en un ensayo de acuerdo con la invención. La descripción también proporciona un kit de ensayo para su uso en un método para la determinación de la CGA.
- 10 Las cromograninas (CG) y secretograninas constituyen una familia de proteínas ácidas que se almacenan conjuntamente con los neurotransmisores y las hormonas peptídicas en el cerebro y en el sistema neuroendocrino difuso (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R., 1992). Aunque estas proteínas son productos de diferentes genes, comparten algunas propiedades estructurales generales tales como una abundancia de restos de aminoácidos ácidos y diversos pares de aminoácidos básicos como posibles posiciones para la escisión postraducciona. Las CG se coalmacenar y se coliberan con los neuropéptidos y las hormonas en las células neuroendocrinas en todo el cuerpo. Se ha sugerido un papel para las CG en la generación de gránulos hormonales y paquetes de hormonas. Además, las CG se pueden escindir en fragmentos más pequeños, que pueden presentar actividades biológicas, tales como la inhibición de la liberación hormonal, la vasodilatación y efectos antimicrobianos (Stridsberg M, 2000)
- 15 20 Los tumores de origen neuroendocrino normalmente se presentan con un aumento de los niveles séricos/plasmáticos de CGA (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Los tumores neuroendocrinos derivan de las células neuroendocrinas y los tumores neuroendocrinos típicos son tumores carcinoides, feocromocitomas, neuroblastomas, cánceres microcíticos de pulmón, adenomas hiperparatiroides, tumores pituitarios y tumores de islotes pancreáticos e incluyendo los síndromes NEM1 y NEM2. Esto también incluye los diferentes síndromes de tumores neuroendocrinos, particularmente los gastrinomas, insulinomas, glucagonomas, somatostatínomas, tumores productores de polipéptido pancreático (PP) (PPomas) y los tumores neuroendocrinos no funcionales (Eriksson, B. et al., 2000). Para estos tumores, se ha demostrado que la CGA es el mejor marcador en circulación (Bajetta, E. et al., 1999).
- 25 30 Por este motivo, es deseable tener un ensayo específico, preciso y rápido para la determinación cualitativa y cuantitativa de la CGA.
- Se han descrito varios métodos de ensayo para la CGA. El documento US4.758.522 se refiere a un método para medir la CGA humana en una muestra basado en un ensayo competitivo que usa una CGA marcada y anticuerpos contra CGA. La cantidad de CGA marcada tanto unida como no unida a los anticuerpos se determina como una medida de la CGA en la muestra. La muestra de CGA se puede obtener a partir de tejido de origen endocrino o adrenal.
- 35 40 El documento EP1078266B1 se refiere a un inmunoensayo de CGA basado en el uso de al menos un anticuerpo (monoclonal o policlonal) que se une específicamente a un epítipo en la secuencia 145-234 de la CGA humana. Más en particular, se refiere al uso de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en la secuencia 145-197 y/o a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en la secuencia 219-234 de la CGA humana en un inmunoensayo para CGA. Opcionalmente, cualquiera de estos dos anticuerpos se pueden combinar en un ensayo de CGA con un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en la secuencia 250-301 de la CGA humana.
- 45 50 Tartaglia et al., Int. J. Pathol. 448: 399-406 (2006) desvelan anticuerpos policlonales de conejo contra diversos epítopos de la CGA, Comunican una expresión variable de epítopos de CGA específicos de región en ECLomas. No se descubrió una relación entre la expresión del tejido y la concentración en plasma de los epítopos de CGA.
- Portela-Gomes et al., J. Histochem Cytochem, 49: 483-490 (2001) describen un anticuerpo monoclonal contra la CGA disponible en el comercio (LK2H10, Boehringer Mannheim) reactivo con un epítipo en el segmento lineal 250 - 283/284 de la CGA.
- 55 60 Las desventajas de los métodos conocidos en la técnica son los resultados falsos positivos o falsos negativos debidos principalmente a reacciones cruzadas con péptidos derivados de la CGA que también están generalmente presentes cerca de la CGA nativa. En particular, los ensayos que emplean anticuerpos policlonales presentan tales desventajas. Se ha sugerido el uso de anticuerpos monoclonales con el fin de superar este problema, sin embargo, los ensayos de CGA basados en anticuerpos monoclonales, tal como se describen en la técnica anterior, de hecho se realizan incluso menos que los ensayos basados en anticuerpos policlonales.
- La presente invención se refiere a un método que supera o mejora estas desventajas.
- El método de ensayo inmuoquímico de acuerdo con la presente invención detecta el polipéptido de la CGA basado en el hecho de que se une específicamente a dos anticuerpos nuevos y distintos. Un anticuerpo se une específicamente a un epítipo del polipéptido de la CGA y otro anticuerpo se une específicamente a otro epítipo del polipéptido de la CGA.
- 65

En el presente documento se proporciona un método para la determinación de un polipéptido de CGA que comprende hacer reaccionar una muestra a ensayar para determinar la presencia o la cantidad de CGA con un conjunto de anticuerpos monoclonales en el que al menos un anticuerpo monoclonal es reactivo con un epítipo en el polipéptido de CGA representado por la secuencia de aminoácidos 236 a 251 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana (representada mediante la SEQ ID NO 2); y en el que al menos un anticuerpo monoclonal distinto es reactivo con un epítipo en el polipéptido de la CGA representado mediante la secuencia de aminoácidos 264 a 279 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana (representada mediante la SEQ ID NO 3).

Con la secuencia de aminoácidos de la CGA humana se refiere en el presente documento a la larga secuencia de 439 aminoácidos comunicada por Konecki et al., 1987 y se representa mediante la SEQ ID NO 1. La expresión polipéptido de CGA pretende indicar la secuencia de polipéptidos de longitud completa de la CGA humana o fragmentos de la misma que son útiles para el diagnóstico de cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente. Tales fragmentos preferentemente deberían comprender al menos los epítopos reactivos con los anticuerpos monoclonales reactivos con las secuencias de aminoácido abarcadas por la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO: 2.

Los ensayos inmunoquímicos de acuerdo con la presente invención se basan en un formato de tipo sándwich - estando la proteína CGA intercalada entre los dos anticuerpos distintos. Los formatos adecuados para la detección de la unión específica de los anticuerpos a la CGA son, por ejemplo, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). También pueden usarse adecuadamente otros métodos de detección.

En el presente documento también se proporciona un anticuerpo contra la CGA y reactivo con un epítipo en el polipéptido representado por los aminoácidos 236 a 251 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana.

En el presente documento también se proporciona un anticuerpo contra la CGA y reactivo con un epítipo en el polipéptido representado por los aminoácidos 264 a 279 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un kit de ensayo para su uso en un método de acuerdo con la presente invención. Tal kit de ensayo comprende inmunorreactivos basados en al menos dos anticuerpos monoclonales, uno reactivo con un epítipo en el polipéptido representado por los aminoácidos 236 a 251 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana, el otro representado por los aminoácidos 264 a 279 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana.

Cada anticuerpo se puede usar tanto como un anticuerpo de captura como un anticuerpo de detección. Los inmunorreactivos incluidos en el kit de ensayo dependen del método y formato del ensayo.

En una realización, al menos uno de los anticuerpos puede acoplarse a un marcador, tal como una enzima o un marcador radiactivo, tanto de forma directa como indirecta.

En una realización adicional, al menos uno de los anticuerpos puede acoplarse a una fase sólida adecuada, tal como una placa de microtitulación.

En una realización adicional, al menos uno de los anticuerpos puede acoplarse a un agente de enlace universal, tal como biotina o estreptavidina (que se sabe que son capaces de unirse entre sí). Tal agente de enlace se puede aplicar para unir el anticuerpo de forma indirecta a una fase sólida o a un marcador antes de o durante el transcurso del método de ensayo.

Las células que producen anticuerpos monoclonales contra uno de los epítopos específicos de la CGA se pueden obtener, por ejemplo, por el método descrito por Köhler y Milstein, 1975.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos monoclonales reactivos con un epítipo en los polipéptidos representados mediante las secuencias de aminoácidos 236 a 251 y 264 a 279 de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana, respectivamente.

En conclusión, la presente invención proporciona métodos con una especificidad y una sensibilidad mejoradas en comparación con los anteriores métodos de la técnica que emplean anticuerpos monoclonales mientras evitan las desventajas de ensayos que emplean anticuerpos policlonales.

Figuras

Figura 1/4. Curva de calibración de la CGA

Figura 2/4. Comparación entre el ensayo de acuerdo con la invención y el ensayo comercial (Dako)

Figura 3/4. Comparación entre el ensayo de acuerdo con la invención y un segundo ensayo comercial (CIS-BIO)

Figura 4/4. El plasma de 107 pacientes con tumores neuroendocrinos y el plasma de 120 donantes de sangre se analizó con NEOLISA. Área de referencia <3,0 (línea roja).

Ejemplos

Materiales

- 5 - Tiras de microtitulación (12x8) recubiertas con anticuerpo monoclonal para el péptido 236 - 251 de la CGA.
- Calibradores que contienen CGA humana en diluyente. Cal 1 = 0 nmol/l (diluyente), Cal 2 = 1 nmol/l, Cal 3 = 5 nmol/l, Cal 4 = 15 nmol/l, Cal 5 = 30 nmol/l, Cal 6 = 50 nmol/l.
- Control de bajo liofilizado (L, del inglés, *Low*).
- Control de alto liofilizado (H, del inglés, *High*).
- 10 - 30 ml diluyente (Dil).
- 150 µl de conjugado que contiene anticuerpos marcados con HRP para el péptido 264 - 279 de la CGA. concentrado a 100x.
- 15 ml de tampón conjugado
- 15 ml de sustrato TMB.
- 15 - 15 ml de solución de terminación (H₂SO₄ 0,5 M).
- 35 ml de solución de lavado, concentrado a 20x.

Método de ELISA de la cromogranina A

20 *Procedimiento*

Todas las soluciones se usaron a temperatura ambiente. La incubación se realizó a temperatura ambiente (20-30 °C).

25 *Dilución de la muestra e incubación*

- Todas las muestras se diluyeron a 5x en una placa de dilución separada antes de la transferencia a una placa de ensayo. Los calibradores, el control bajo, el control alto y el plasma del paciente se diluyeron todos con 50 µl de plasma + 200 µl de diluyentes antes de su uso. Posteriormente se mezcló a fondo pipeteando arriba y abajo antes
- 30 de transferir 100 µl por duplicado a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó durante 60 minutos.

Tras la incubación de la muestra

- La placa de ensayo se lavó tres (3) veces con 300 µl de solución de lavado/pocillo, rellenando y vaciando los pocillos
- 35 cada vez. Tras el último lavado, se vaciaron los pocillos poniendo en contacto la tira con un tejido absorbente.

Adición del conjugado

- Se añadieron 100 µl de conjugado a cada pocillo.
- 40 La placa de ensayo se incubó durante 30 minutos.

Tras la incubación del conjugado

- 45 La placa de ensayo se lavó como anteriormente.
- Se añadió la solución de sustrato

- Se añadieron 100 µl de sustrato TMB a cada pocillo, y la placa de ensayo se incubó en la oscuridad durante 15
- 50 minutos.

Adición de la solución de terminación

- Se añadieron 100 µl de solución de terminación a cada pocillo. La DO (densidad óptica) se leyó a 450 nm a las 2
- 55 horas en un lector de microplaca. La DO se leyó a 620 nm como una longitud de onda de referencia.

Ejemplo 1

Anticuerpos monoclonales

- 60 Los anticuerpos monoclonales que reaccionan de manera específica con los polipéptidos representados mediante las secuencias de aminoácidos 236 a 251 (indicado adicionalmente en el presente documento como anticuerpo 2E8), y las secuencias de aminoácidos 264 a 279 (indicado adicionalmente en el presente documento como anticuerpo 1 H6), respectivamente, de la secuencia de aminoácidos de la CGA humana se han preparado
- 65 esencialmente mediante el método de Köhler y Milstein, 1975.

El anticuerpo 2E8 se usa en el ELISA como anticuerpo de captura; el anticuerpo 1 H6 se usa como el anticuerpo de detección acoplado a HRP.

Ejemplo 2

Curva de calibración del inmunoensayo ligado a enzimas de la CGA

Se proporciona un conjunto de seis calibradores que tienen valores de 0 nmol/l para el calibrador 1, 1 nmol/l para el calibrador 2, 5 nmol/l para el calibrador 3, 15 nmol/l para el calibrador 4, 30 nmol/l para el calibrador 5, 50 nmol/l para el calibrador 6, respectivamente.

El calibrador en el kit es un péptido sintético que se corresponde con la CGA. El calibrador de péptidos se ajusta para dar una respuesta igual a un fragmento nativo, purificado de la CGA (Stridsberg, M *et al.* 1993, Stridsberg *et al.* 1995)

Se construye una curva de calibración representando la DO frente a los valores de los seis calibradores en nmol/l.

Los resultados de las mediciones del calibrador se representan en la Tabla 1 y en la Figura 1

Tabla 1

Calibrador de ejemplo	nmol/l CGA	DO
1	0	0,056
2	1	0,178
3	5	0,785
4	15	1,743
5	30	2,423
6	50	2,886

Ejemplo 3

Correlación entre el sistema de ensayo de acuerdo con el Ejemplo 1 y un kit de ensayo comercial (Dako)

Para esta comparación se utilizó una colección de muestras de pacientes que se ensayaron en un sistema de ensayo de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente invención, junto con un kit de ensayo Chromogranin A ELISA Kit (Código K0025) obtenido comercialmente de Dako (Dako Denmark A/S; Produktionsvej 42; DK-2600 Glostrup; Dinamarca). Este último kit de ensayo se usa ampliamente y se basa en un ensayo simplificado de tipo sándwich de anticuerpo policlonal doble en donde las muestras y el anti-cromogranina A conjugado con peroxidasa se incuban de manera simultánea en micropocillos recubiertos con anti-cromogranina A. Se indica que todos los anticuerpos en este kit de ensayo son anticuerpos policlonales de conejo. El kit de ensayo Dako se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el ensayo, la DO se lee tanto a 450 nm como a 650 nm.

Los resultados de esta comparación se representan en la Figura 2. En la presente figura, los valores en el eje X son los datos obtenidos del kit de ensayo de acuerdo con la presente invención (ED NeoLisa) en nmol/l, y el valor en el eje Y son los datos obtenidos con el kit de ensayo Dako (DAKO) en U/l.

Se puede concluir que la correlación entre el kit de ensayo de acuerdo con la presente invención y el ELISA de Dako es excelente. Factor de correlación: 0,942.

Ejemplo 4

Correlación entre el sistema de ensayo de acuerdo con el Ejemplo 1 y un segundo kit de ensayo comercial (CIS-BIO)

Para esta comparación se utilizó una colección de muestras de pacientes que se ensayaron en un sistema de ensayo de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente invención, junto a un kit de ensayo CIS-BIO Chromogranin A ELISA (Chromo@; Prod.nº.: CGA-ELISA) obtenido comercialmente de CIS BIO. Este último kit se corresponde con el kit de ensayo descrito en el documento EP1078266B1. Se basa en un ensayo de tipo sándwich, en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a un epítipo en la secuencia de aminoácidos 145 a 197 de la secuencia de la cromogranina humana y el anticuerpo de detección es un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a un epítipo en la secuencia de aminoácidos 219 a 234 de la secuencia de la cromogranina humana. El kit de ensayo CIS- BIO se usó de acuerdo con las instrucciones del

fabricante.

Los resultados de esta comparación se representan en la Figura 3. En la presente figura, los valores en el eje X son los datos obtenidos del kit de ensayo CIS-BIO (CIS-BIO) en ng/l, y los valores en el eje Y son los datos obtenidos del kit de ensayo de acuerdo con la presente invención (ED NeoLISA) en nmol/l.

La correlación entre el NEOLISA de los presentes inventores y el CisBio CgA ELISA es mala. Factor de correlación: 0,451

Ejemplo 5

Sensibilidad clínica

Se analizaron un total de 107 muestras de plasma-heparina con caracterización clínica junto con 120 muestras de plasma de donantes de sangre. La Tabla 2 y la Figura 4 resumen los resultados.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad clínica.

Diagnóstico	Total	Positivo	Negativo	Sensibilidad (%)
Tumor de tipo enterocromafina (ECL)	4	3	1	75
Tumor endocrino del páncreas (EPT)	30	19	11	63
Carcinoide del intestino grueso (FGC)	10	7	3	70
Carcinoide pulmonar (CarcPulm)	9	4	5	44
Carcinoide del intestino medio (MGC)	47	28	19	60
Diferenciación neurocrina (NE DIFF)	6	2	4	33
Paraganglioma (Paragangl)	1	1	0	100
Total	107	64	43	60
Donantes de sangre (control)	120	2	118	98

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eurodiagnostica AB
 <120> Inmunoensayo
 <130> 156 WO
 <150> EP10161375.0
 <151> 28-04-2010
 <160>3
 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 623 102 T3

Leu	Pro	Val	Asn	Ser	Pro	Met	Asn	Lys	Gly	Asp	Thr	Glu	Val	Met	Lys
1				5					10					15	
Cys	Ile	Val	Glu	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ser	Pro	Met
			20					25					30		
Pro	Val	Ser	Gln	Glu	Cys	Phe	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Asp	Glu	Arg	Ile
		35					40					45			
Leu	Ser	Ile	Leu	Arg	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Gln	Asp	Leu
	50					55					60				
Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Glu	Arg	Ala	His	Gln	Gln	Lys	Lys	His	Ser
65					70					75					80
Gly	Phe	Glu	Asp	Glu	Leu	Ser	Glu	Val	Leu	Glu	Asn	Gln	Ser	Ser	Gln
				85					90					95	
Ala	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Val	Glu	Glu	Pro	Ser	Ser	Lys	Asp	Val	Met
			100					105					110		
Glu	Lys	Arg	Glu	Asp	Ser	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Glu	Ala	Thr
		115					120					125			
Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Gln	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Met	Gln	Glu	Ser	Lys
	130					135					140				
Ala	Glu	Gly	Asn	Asn	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
145					150					155					160
Glu	Ala	Thr	Asn	Thr	His	Pro	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Lys	Tyr
				165					170					175	

ES 2 623 102 T3

Pro Gly Pro Gln Ala Glu Gly Asp Ser Glu Gly Leu Ser Gln Gly Leu
 180 185 190
 Val Asp Arg Glu Lys Gly Leu Ser Ala Glu Pro Gly Trp Gln Ala Lys
 195 200 205
 Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Ala Gly Glu Glu
 210 215 220
 Ala Val Pro Glu Glu Glu Gly Pro Thr Val Val Leu Asn Pro His Pro
 225 230 235 240
 Ser Leu Gly Tyr Lys Glu Ile Arg Lys Gly Glu Ser Arg Ser Glu Ala
 245 250 255
 Leu Ala Val Asp Gly Ala Gly Lys Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gln Asp
 260 265 270
 Pro Glu Gly Lys Gly Glu Gln Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu
 275 280 285
 Glu Glu Met Ala Val Val Pro Gln Gly Leu Phe Arg Gly Gly Lys Ser
 290 295 300
 Gly Glu Leu Glu Gln Glu Glu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Trp Glu Asp
 305 310 315 320
 Ser Lys Arg Trp Ser Lys Met Asp Gln Leu Ala Lys Glu Leu Thr Ala
 325 330 335
 Glu Lys Arg Leu Glu Gly Gln Glu Glu Glu Glu Asp Asn Arg Asp Ser
 340 345 350
 Ser Met Lys Leu Ser Phe Arg Ala Arg Ala Tyr Gly Phe Arg Gly Pro
 355 360 365
 Gly Pro Gln Leu Arg Arg Gly Trp Arg Pro Ser Ser Arg Glu Asp Ser
 370 375 380
 Leu Glu Ala Gly Leu Pro Leu Gln Val Arg Gly Tyr Pro Glu Glu Lys
 385 390 395 400
 Lys Glu Glu Glu Gly Ser Ala Asn Arg Arg Pro Glu Asp Gln Glu Leu
 405 410 415
 Glu Ser Leu Ser Ala Ile Glu Ala Glu Leu Glu Lys Val Ala His Gln
 420 425 430
 Leu Gln Ala Leu Arg Arg Gly
 435

<210>2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> sintética

<400>2

Leu Asn Pro His Pro Ser Leu Gly Tyr Lys Glu Ile Arg Lys Gly Glu
1 5 10 15

5 <210>3
<211> 16
<212> PRT
<213> sintética

10 <400>3

Lys Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gln Asp Pro Glu Gly Lys Gly Glu Gln
1 5 10 15

Referencias

- 15 1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. y Bombardieri, E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours. *Cancer* 1999, 86:858-865.
- 20 2. Eriksson, B., Oberg, K. y Stridsberg, M. Tumour markers in neuroendocrine tumours. *Digestion* 2000, 62:33-38.
3. Köhler y Milstein. *Nature* 1975, 256:495.
4. Konecki et al. *Biol. Chem.* 1987, 262: 17026-17030.
5. O'Connor, D.T. y Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *New England Journal of Medicine* 1986, 314:1145-1151.
- 25 6. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. y Oberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. *Journal of Endocrinology* 1993, 139:329-337.
7. Stridsberg, M., Oberg, K., Li, Q., Engstrom, U. y Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *Journal of Endocrinology* 1995, 144:49-59.
- 30 8. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. *Advanced Experimental and Medical Biology* 2000, 482:319-327.
9. Winkler, H. y Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992, 49:497-528.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eurodiagnostica AB

<120> Inmunoensayo

<130> 156 WO
<150> EP10161375.0
<151> 28-04-2010

<160>3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 439
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 623 102 T3

Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys
1 5 10 15

Cys Ile Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met
20 25 30

Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile
35 40 45

Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu
50 55 60

Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys Lys His Ser
65 70 75 80

Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln
85 90 95

Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met
100 105 110

Glu Lys Arg Glu Asp Ser Lys Glu Ala Glu Lys Ser Gly Glu Ala Thr
115 120 125

Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu Pro Met Gln Glu Ser Lys
130 135 140

Ala Glu Gly Asn Asn Gln Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu
145 150 155 160

Glu Ala Thr Asn Thr His Pro Pro Ala Ser Leu Pro Ser Gln Lys Tyr
165 170 175

ES 2 623 102 T3

Pro	Gly	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Asp	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Gln	Gly	Leu	180	185	190	
Val	Asp	Arg	Glu	Lys	Gly	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Gly	Trp	Gln	Ala	Lys	195	200	205	
Arg	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	210	215	220	
Ala	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Pro	Thr	Val	Val	Leu	Asn	Pro	His	Pro	225	230	235	240
Ser	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Ile	Arg	Lys	Gly	Glu	Ser	Arg	Ser	Glu	Ala	245	250	255	
Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	Ala	Gln	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Gly	Lys	Gly	Glu	Gln	Glu	His	Ser	Gln	Gln	Lys	Glu	Glu	Glu	275	280	285	
Glu	Glu	Met	Ala	Val	Val	Pro	Gln	Gly	Leu	Phe	Arg	Gly	Gly	Lys	Ser	290	295	300	
Gly	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Trp	Glu	Asp	305	310	315	320
Ser	Lys	Arg	Trp	Ser	Lys	Met	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Glu	Leu	Thr	Ala	325	330	335	
Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Gly	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Asn	Arg	Asp	Ser	340	345	350	
Ser	Met	Lys	Leu	Ser	Phe	Arg	Ala	Arg	Ala	Tyr	Gly	Phe	Arg	Gly	Pro	355	360	365	
Gly	Pro	Gln	Leu	Arg	Arg	Gly	Trp	Arg	Pro	Ser	Ser	Arg	Glu	Asp	Ser	370	375	380	
Leu	Glu	Ala	Gly	Leu	Pro	Leu	Gln	Val	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Glu	Lys	385	390	395	400
Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn	Arg	Arg	Pro	Glu	Asp	Gln	Glu	Leu	405	410	415	
Glu	Ser	Leu	Ser	Ala	Ile	Glu	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Val	Ala	His	Gln	420	425	430	

ES 2 623 102 T3

Leu Gln Ala Leu Arg Arg Gly
435

5
<210>2
<211> 16
<212> PRT
<213> sintética

<400>2

10
Leu Asn Pro His Pro Ser Leu Gly Tyr Lys Glu Ile Arg Lys Gly Glu
1 5 10 15

15
<210>3
<211> 16
<212> PRT
<213> sintética

<400> 3

Lys Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gln Asp Pro Glu Gly Lys Gly Glu Gln
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método de tipo sándwich para la detección de un polipéptido de cromogranina A (CGA) que comprende hacer reaccionar una muestra a ensayar para la presencia o la cantidad del polipéptido de CGA con un conjunto de anticuerpos monoclonales en donde cada anticuerpo monoclonal se usa como un anticuerpo de captura o como un anticuerpo de detección, y en donde al menos un anticuerpo monoclonal es reactivo con un epítipo en el polipéptido de CGA representado mediante la secuencia de aminoácidos 236 a 251 de la secuencia de aminoácidos de CGA humana (representada mediante la SEQ ID NO 2); y en donde al menos un anticuerpo monoclonal distinto es reactivo con un epítipo en el polipéptido de CGA representado mediante la secuencia de aminoácidos 264 a 279 de la secuencia de aminoácidos de CGA humana (representada mediante la SEQ ID NO 3).
2. Un método de tipo sándwich de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de los anticuerpos monoclonales se acopla con:
 - a) un soporte sólido, o
 - b) un marcador detectable, o
 - c) un agente de enlace específico.
3. Un método de tipo sándwich de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el soporte sólido es una placa de microtitulación.
4. Un método de tipo sándwich de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3 en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un elemento radiactivo y un compuesto radiactivo.
5. Un método de tipo sándwich de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 - 4 en el que el agente de enlace específico es biotina o estreptavidina.
6. Un kit de ensayo para la detección de un polipéptido de que comprende al menos:
 - a. Un anticuerpo monoclonal reactivo con un epítipo en el polipéptido representado por los aminoácidos 236 a 251 de la secuencia de aminoácidos de CGA humana (representada por la SEQ ID NO 2); y
 - b. Un anticuerpo monoclonal reactivo con un epítipo en el polipéptido representado por los aminoácidos 264 a 279 de la secuencia de aminoácidos de CGA humana (representada por la SEQ ID NO 3).

Fig. 1

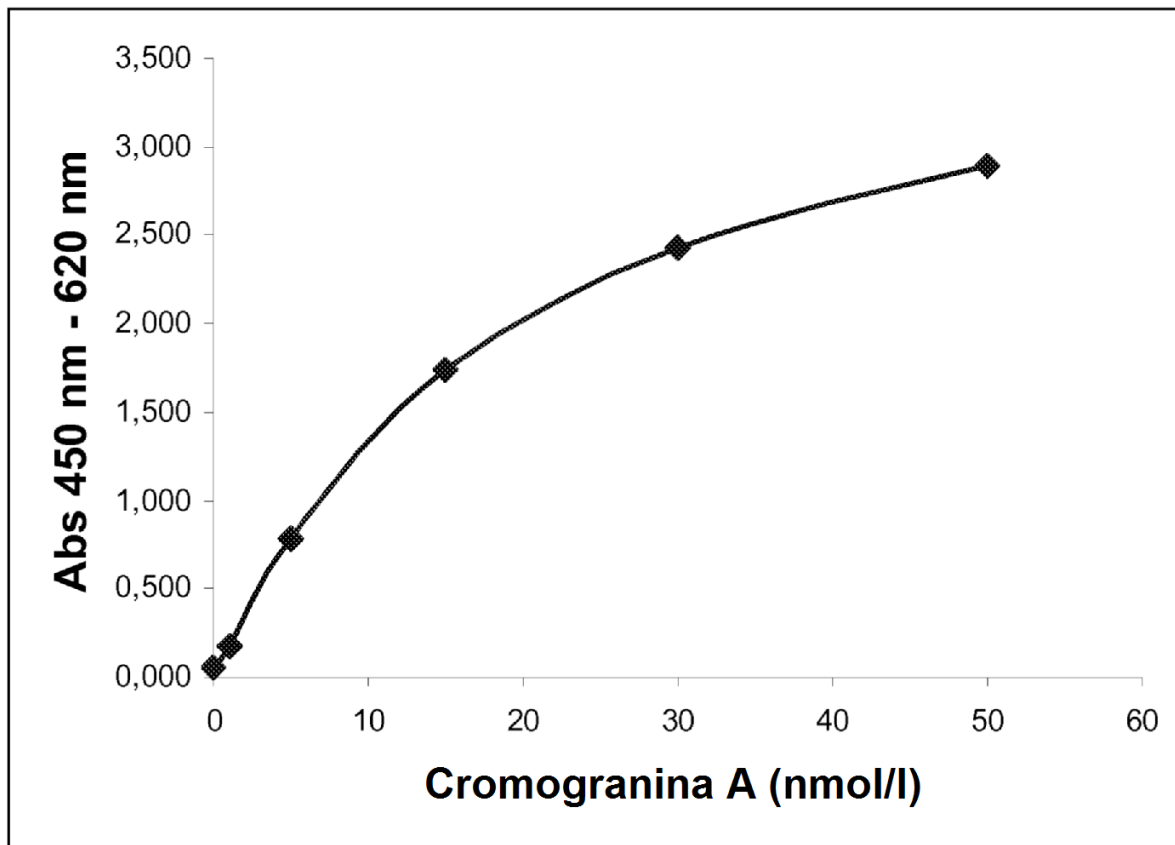


Fig. 2

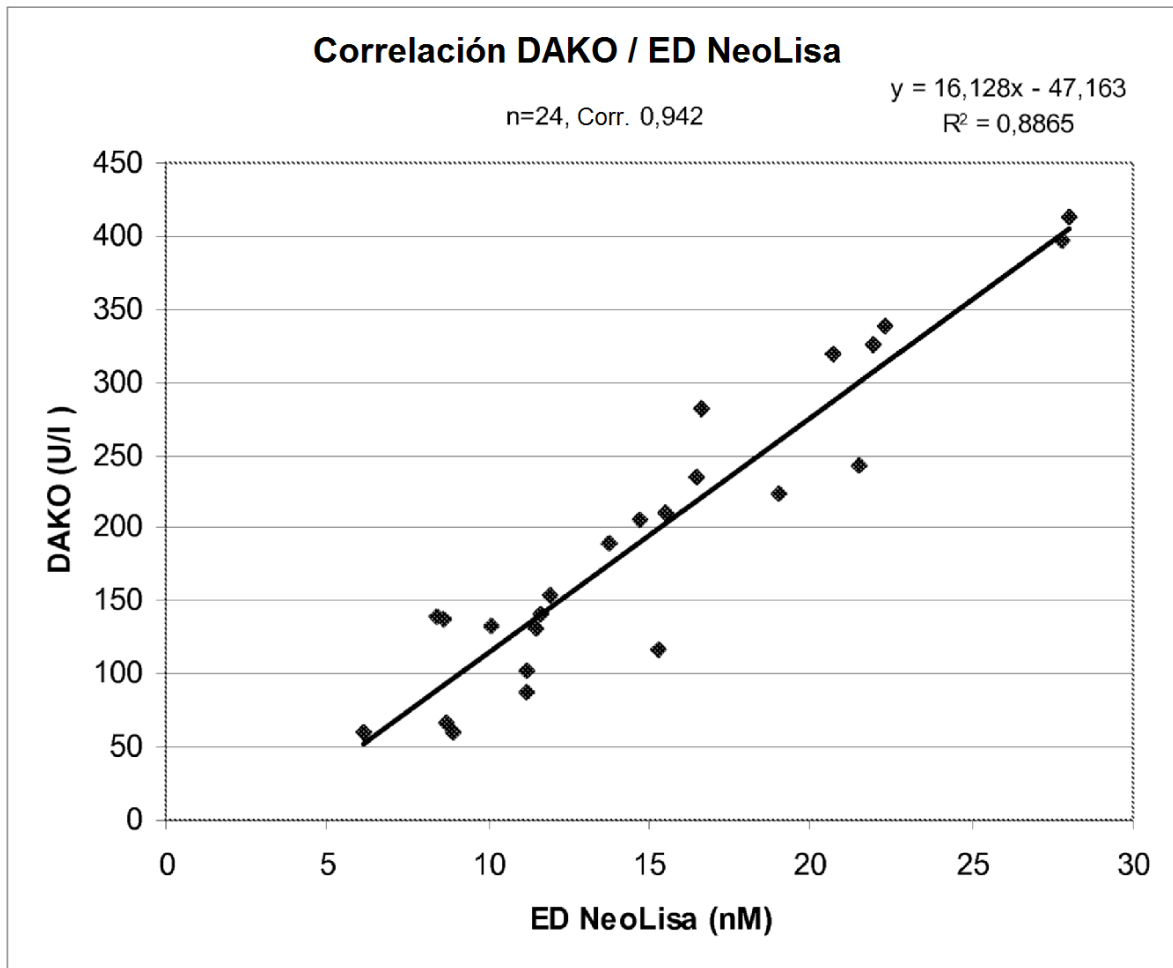


Fig. 3

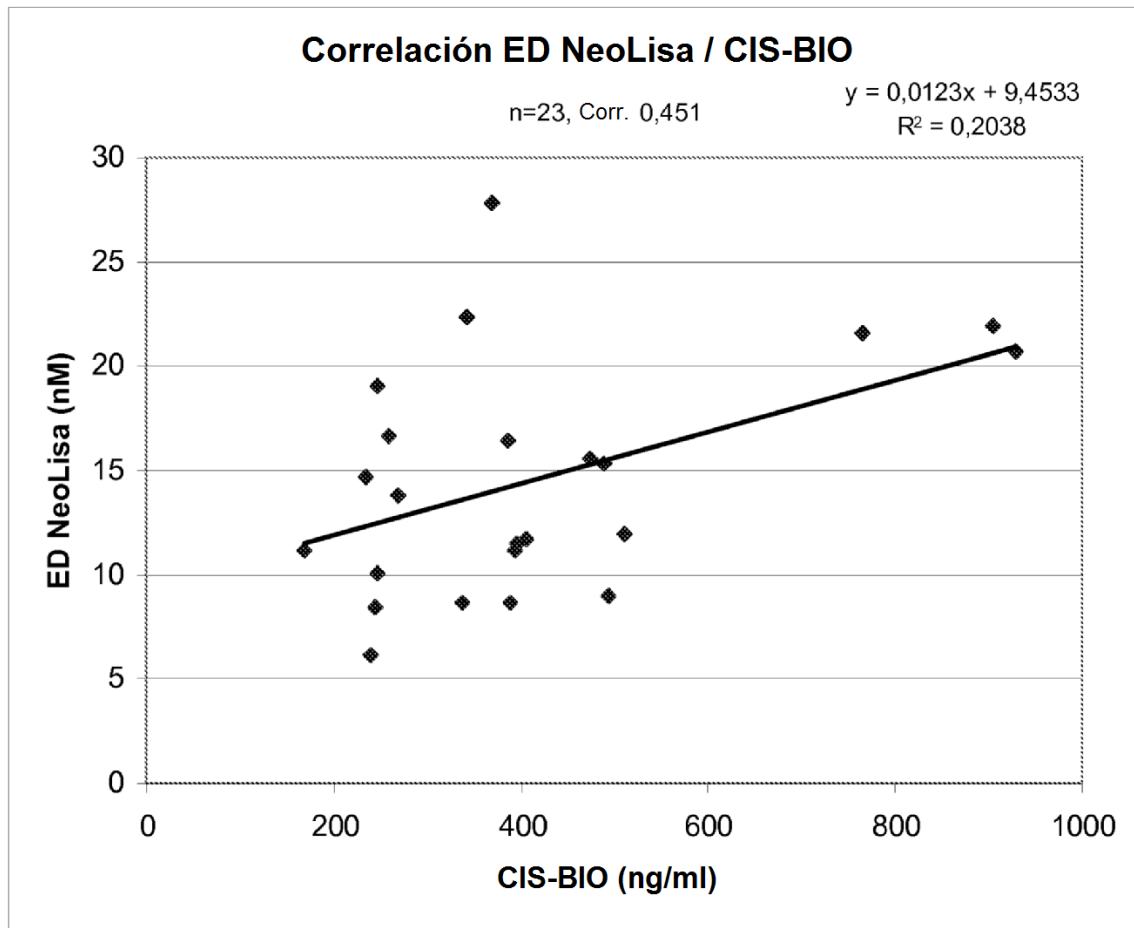


Fig. 4

