

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 332**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2010 PCT/EP2010/055648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10125076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010 E 10715266 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2425259**

54 Título: **Inmunoensayo para la detección de procalcitonina**

30 Prioridad:

28.04.2009 EP 09158983

10.07.2009 EP 09165227

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

04.05.2018

73 Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)

Neuendorfstrasse 25

16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

STRUCK, JOACHIM

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 666 332 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 la detección de procalcitonina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico clínico. En particular, la presente invención se refiere a la determinación del nivel de procalcitonina (PCT) en una muestra obtenida de un líquido corporal de un sujeto.

10 Antecedentes de la invención

La procalcitonina (PCT) es conocida como un biomarcador que refleja la presencia y gravedad de las infecciones bacterianas locales y sistémicas, es decir, la sepsis (Assicot et al., Lancet 341:515-8, 1993; Muller et al., Crit. Care Med. 28:977-83, 2000.; Harbarth et al., Am. J. Respir. Crit.Care Med.164:396-402, 2001; Becker et al., Crit. Care Med. 36:941-52, 2008; Becker et al, J Clin Endocrinol. Metab. 89:1512-25, 2004; Nobre et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med.177:498-505, 2008; Christ-Crain et al., Lancet 363:600-7, 2004; Stolz et al., Chest 131:9-19, 2007; Christ-Crain et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med.174:84-93, 2006; Briel et al., Arch. Intern. Med.168:2000-7, 2008; comentario 7-8).

20 Los anticuerpos específicos de antígeno son una herramienta clave para el desarrollo de los inmunoensayos. Se han descrito varios anticuerpos contra los péptidos derivados de PCT, que han sido utilizados en inmunoensayos para detectar la PCT pero sólo unos cuantos han sido sometidos a ensayo para su utilización en inmunoensayos de tipo sándwich para detectar la PCT nativa (Tabla 1). Se han desarrollado inmunoensayos de tipo sándwich que utilizan anticuerpos contra las fracciones calcitonina y catacalcina de la PCT con el fin de medir la PCT en muestras
25 humanas de modo rutinario.

Para las condiciones asociadas a las concentraciones elevadas de PCT (excluyendo el carcinoma medular de tiroides), especialmente las infecciones bacterianas y la sepsis, se cree que no sólo la PCT de longitud completa (de aproximadamente 13 kDa) sino también los fragmentos derivados de PCT se encuentran presentes en la circulación
30 sanguínea del paciente. En particular, se ha comentado que se produce el corte proteolítico inmediatamente cadena arriba de la fracción calcitonina de la PCT (Muller, et al. Crit. Care Med. 28:977-83, 2000.; Whang et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 83:3296-301, 1998), que conduciría a dos fragmentos (ambos de aprox. 6-7 kDa). Sin embargo, la evidencia experimental de ello es escasa. La PCT circulante ha sido aislada de pacientes con sepsis mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo dirigido contra la fracción calcitonina de la PCT y se ha concluido
35 que PCT3-116 es la especie de PCT circulante principal (Weglohner et al., Peptides 22:2099-103, 2001). Sin embargo, se han llevado a cabo varias etapas de selección en dicho análisis, es decir, sólo se han purificado los péptidos con un epítipo que contiene calcitonina y no se han analizado todas las fracciones relevantes de la HPLC de fase inversa posterior. Los inmunoensayos para la PCT tampoco han resultado adecuados para resolver la cuestión de la fragmentación de la PCT ya que se utilizaron o bien ensayos competitivos que incluían un único anticuerpo (Whang, et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83:3296-301, 1998) o bien inmunoensayos de tipo sándwich que incluían dos anticuerpos con epítipos situados próximos entre sí en la mitad C-terminal de la PCT y que no cubrían una amplia fracción de la PCT (Morgenthaler et al., Clin. Chem. 48:788-90, 2002).

Se han utilizado anticuerpos contra el extremo N-terminal mismo de la PCT junto con un anticuerpo contra la
45 fracción catacalcina de la PCT en un ensayo de tipo sándwich para detectar en muestras de pacientes sépticos especies de PCT con un extremo N-terminal intacto (documento nº DE 10 2007 009 751). Se ha encontrado que las especies de PCT con extremo N-terminal intacto presentan una cinética in vivo diferente de la inmunorreactividad de la PCT que se detecta mediante inmunoensayo de tipo sándwich con anticuerpos contra las fracciones calcitonina y catacalcina de la PCT. Además, dichas especies de PCT con extremo N-terminal intacto se ha encontrado que constituyen únicamente aprox. 10% a 20% de la inmunorreactividad de la PCT que se detecta con un inmunoensayo
50 de tipo sándwich utilizando anticuerpos contra las fracciones calcitonina y catacalcina de la PCT. Sin embargo, no está claro en qué sitio o sitios entre el extremo N-terminal mismo de la PCT y la fracción calcitonina se produce el corte o cortes proteolíticos que conducen a las diferentes concentraciones de analitos observadas. Aunque se ha supuesto que PCT1-116 se corta N-terminalmente mediante la acción de la DPP IV, conduciendo a PCT3-116 (Weglohner, et al. Peptides 22:2099-103, 2001.; Wrenger et al., FEBS Lett. 466:155-9, 2000), no está claro si
55 adicional o alternativamente PCT1-116 puede cortarse en otro sitio en el medio de la molécula.

De esta manera, no está claro si un anticuerpo que presenta un epítipo aproximadamente cadena arriba de la
60 fracción calcitonina (más exactamente, cadena arriba de la posición 53) de la PCT que no incluye el extremo N-terminal mismo de la PCT (es decir, la posición 1 de PCT1-116) junto con un anticuerpo que presenta otro epítipo, por ejemplo un epítipo cadena abajo de la posición 53 (tal como, por ejemplo, un epítipo dentro de la fracción calcitonina o catacalcina de la PCT) puede utilizarse en un inmunoensayo de tipo sándwich para detectar la PCT nativa en una muestra de paciente comparablemente a un inmunoensayo de tipo sándwich que utilice anticuerpos que presentan un epítipo dentro de la fracción calcitonina de la PCT y un anticuerpo que presenta un epítipo
65 cadena abajo de ella, tal como, por ejemplo, un anticuerpo con un epítipo dentro de la fracción catacalcina de la PCT. Dicho inmunoensayo de tipo sándwich ha sido descrito recientemente utilizando la PCT recombinante como

analito aunque la recuperación de la PCT nativa a partir de las muestras del paciente no ha sido evaluada y el potencial problema de la fragmentación de la PCT ni siquiera se ha comentado ni especulado sobre el mismo (Kramer et al., Anal Bioanal Chem. 392:727-36, 2008).

5 HyTest, "HyTest News - Procalcitonin", Turku, Finland, (200802), páginas 1 a 8, Hoja de datos de producto, URL: http://www.hytest.fi/data_sheets/newsletters/Procalcitonin%20Newsletter.pdf, (20100528) y "GENERAL PRODUCT CATALOG 2005-2006", HYTEST.FI, (200506) dan a conocer anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) para determinar la PCT.

10 La presente invención se basa en parte en el inesperado resultado de los inventores de que los anticuerpos dirigidos contra epítomos contenidos en las posiciones aminoácidas 2 a 52 de la procalcitonina resultan adecuados para medir la PCT utilizando inmunoensayos de tipo sándwich ya que la PCT no ha sido cortada en la parte central de la molécula.

15 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un ensayo mejorado para la determinación de los niveles de PCT en muestras de líquidos corporales basándose en una nueva combinación de anticuerpos dirigidos contra la PCT.

20 La memoria se refiere a un método in vitro para la detección de la procalcitonina o un fragmento de la misma de por lo menos 20 residuos aminoácidos de longitud en una muestra biológica obtenida de un líquido corporal obtenida de un sujeto, que comprende las etapas de:

25 a. poner en contacto dicha muestra con por lo menos dos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos dirigidos contra diferentes epítomos dentro de la procalcitonina,
b. detectar cualitativa o cuantitativamente la unión de dichos dos o más anticuerpos a procalcitonina o dicho fragmento de la misma, en el que la unión indica la presencia o concentración de procalcitonina o dicho fragmento en dicha muestra,

30 en el que por lo menos un anticuerpo o fragmento funcional del mismo está dirigido contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 2 a 52 de la procalcitonina.

De esta manera, la presente invención se refiere a un método según la reivindicación 1, un anticuerpo según la reivindicación 2 y un kit según la reivindicación 3.

35 Preferentemente, el otro anticuerpo o fragmento funcional del mismo está dirigido contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina.

40 Los dos o más anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención preferentemente no muestran reactividades cruzadas significativas (es decir >10%) con los epítomos del otro u otros anticuerpos respectivos. Un anticuerpo dirigido contra un epítomo en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 2 a 52 de la procalcitonina es específico para dicho epítomo y de esta manera no muestra reactividad cruzada significativa con un epítomo en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina y viceversa. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención son específicos para su epítomo en la PCT y no muestran reactividad cruzada significativa respecto a otros epítomos, en particular epítomos no solapantes en dicho péptido.

45 Preferentemente en la presente memoria, el epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 2 a 52 de la procalcitonina es un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 40 de la procalcitonina. Más preferentemente, el epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 40 de la procalcitonina se selecciona de entre un grupo que consiste en un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 21 a 40 de la procalcitonina, un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 35 de la procalcitonina y un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 25 a 37 de la procalcitonina.

55 El epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina preferentemente es un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 96 a 116 de la procalcitonina o un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 60 a 91 de la procalcitonina.

60 En una realización particular del método de la presente invención, se cuantifica la concentración de procalcitonina o de un fragmento de la misma en la muestra.

Preferentemente, el sujeto según la presente invención es un ser humano o animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente el sujeto es un ser humano.

65

En el contexto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo, que está dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina, es un anticuerpo policlonal o monoclonal. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo, que está dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina es un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo o fragmento funcional del mismo, que está dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 2 a 52 de la procalcitonina, preferentemente es una IgG o se deriva de una IgG. De manera similar, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo, que está dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina, preferentemente es una IgG o se deriva de una IgG.

El líquido corporal en el contexto del método de la presente invención se selecciona preferentemente de entre el grupo de sangre, suero, plasma, líquido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones pleurales.

En una realización preferente del método de la presente invención, se inmoviliza sobre una superficie sólida por lo menos uno de entre por lo menos dos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos. Más preferentemente, uno de entre por lo menos dos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos se inmoviliza sobre una superficie sólida. Resulta preferente que por lo menos uno de entre el otro anticuerpo o anticuerpos se encuentra marcado, preferentemente mediante unión covalente de un pigmento quimioluminiscente o fluorescente.

En una realización particular del método, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo que está dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 2 a 52 de la procalcitonina se inmoviliza sobre una superficie sólida. En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo que está dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina se inmoviliza sobre una superficie sólida.

La presente invención se refiere además a un anticuerpo o a un fragmento funcional del mismo dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 40 de la procalcitonina.

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo está dirigido contra un epítipo se selecciona de entre un grupo que consisten en un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 21 a 40 de la procalcitonina, un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 35 de la procalcitonina y un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 25 a 37 de la procalcitonina. Resulta preferente que el anticuerpo sea monoclonal.

El anticuerpo de la presente invención puede producirse preferentemente mediante inmunización genética. Brevemente, pueden generarse anticuerpos monoclonales contra la PCT mediante inmunización genética, por ejemplo principalmente siguiendo el procedimiento explicado en Costagliola et al., J. Immunol. 160:1458-65, 1998. La secuencia codificante de la PCT puede clonarse mediante procedimientos estándares en un vector. A continuación, un animal, por ejemplo un ratón, puede recibir una inyección con dicho vector. Las inyecciones pueden repetirse tras, por ejemplo, 3 y 6 semanas. Los animales se sacrifican tras, por ejemplo, 18 semanas. A continuación, se fusionan las células de bazo de los animales sacrificados con células de mieloma SP2/0 para generar líneas celulares de hibridoma que seguidamente se criban para su capacidad de secretar anticuerpos que se unirían a la PCT humana recombinante inmovilizada.

El anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 40 de la procalcitonina según la presente invención puede producirse preferentemente mediante una línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ bajo el número DSM ACC2993 o DSM ACC2996 o DSM ACC2997. Dichas líneas celulares producen anticuerpos monoclonales particulares dirigidos contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 40 de la procalcitonina según la invención. La línea celular de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal FX7A7 fue depositada en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) el 4 de junio de 2009 bajo el número de acceso DSM ACC2997. La línea celular de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal FW5H6 fue depositada en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) el 4 de junio de 2009 bajo el número de acceso DSM ACC2996. La línea celular de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal FX1G5 fue depositada en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) el miércoles, 29 de abril de 2009 bajo el número de acceso DSM ACC2993. Todas las líneas celulares de hibridoma han sido producidas según los principios descritos anteriormente en la presente memoria y en mayor detalle en el Ejemplo 1.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit que por lo menos comprende:

- a. un primer anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 2 a 52 de la procalcitonina y
- b. un segundo anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, dirigido contra un epítipo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 53 a 116 de la procalcitonina.

Preferentemente, el primer anticuerpo del kit está dirigido contra un epítopo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 40 de la procalcitonina, preferentemente contra un epítopo que se selecciona de entre un grupo que consiste en un epítopo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 21 a 40 de la procalcitonina, un epítopo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 16 a 35 de la procalcitonina y un epítopo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 25 a 37 de la procalcitonina.

Resulta preferente que el primer anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal. También resulta preferente que el segundo anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal.

En una realización preferente del kit, el segundo anticuerpo está dirigido contra un epítopo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 60 a 91 de la procalcitonina o dirigido contra un epítopo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 96 a 116 de la procalcitonina.

La invención se refiere además a la utilización de un kit según la presente invención en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich para la detección y/o cuantificación de la procalcitonina o un fragmento de la misma en una muestra biológica de un líquido corporal. Dicho fragmento comprende por lo menos una secuencia que comprende los dos epítopos contra los que están dirigidos los dos anticuerpos.

Además, la presente invención se refiere a la utilización del método según la presente invención, al anticuerpo según la presente invención o al kit según la presente invención para la determinación de la presencia o la ausencia de procalcitonina o un fragmento de la misma o para la cuantificación de la procalcitonina o un fragmento de la misma en una muestra biológica de un líquido corporal.

Preferentemente, el método, anticuerpo y kit se utilizan para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del riesgo, seguimiento de la terapia, guía a la terapia o estratificación para la aplicación de medidas terapéuticas de una enfermedad o condición asociada a niveles elevados de procalcitonina.

La enfermedad o condición preferentemente se selecciona de entre el grupo de las infecciones bacterianas locales (en particular en las vías respiratorias y en el pulmón), sepsis, sepsis severa y choque séptico. La enfermedad o condición también puede seleccionarse de entre el grupo de enfermedades no infecciosas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, las enfermedades cardiovasculares (síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis e ictus), el cáncer, la diabetes, las enfermedades gastrointestinales crónicas, las enfermedades renales crónicas, la hipertensión, las enfermedades ortopédicas, incluyendo la osteoporosis, y las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. Todas las enfermedades o condiciones indicadas anteriormente pueden estar asociadas o no a una o más comorbilidades.

Los anticuerpos de la presente invención preferentemente presentan afinidades para sus epítopos respectivos comprendidas en el intervalo de entre 10^8 y 10^{11} M^{-1} , preferentemente superiores a 10^9 M^{-1} .

El término "anticuerpo" generalmente comprende los anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de unión de los mismos, en particular los fragmentos Fc, así como los denominados "anticuerpos de cadena sencilla" (Bird R. E. et al. Science 242:423-6, 1988), o los anticuerpos quiméricos, humanizados, en particular injertados con RDC y los diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-8, 1993). Se encuentran comprendidas además las proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, la expresión fágica para la unión específica a la molécula de interés contenida en una muestra. En el presente contexto, la expresión «unión específica» se refiere a anticuerpos generados contra la molécula de interés o un fragmento de la misma. Un anticuerpo se considera específico en el caso de que su afinidad para la molécula de interés o el fragmento anteriormente indicado de la misma sea por lo menos preferentemente 50 veces superior, más preferentemente 100 veces superior, todavía más preferentemente 1.000 veces superior que hacia otras moléculas comprendidas en una muestra que contiene la molécula de interés. Es bien conocido de la técnica cómo preparar anticuerpos y seleccionar anticuerpos con una especificidad dada. Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, resultan preferentes los anticuerpos monoclonales.

Los ensayos y métodos de detección preferentes según la presente invención comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA), los inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, los ensayos de micromatrices de proteínas y los formatos de ensayo rápido, tales como, por ejemplo, los ensayos de tira inmunocromatográfica.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos de tipo sándwich competitivos y no competitivos. En una realización particularmente preferente que utiliza los dos anticuerpos según la presente invención, el ensayo se encuentra en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo en el que la PCT o un fragmento de la misma que debe detectarse y/o cuantificarse se une al primer anticuerpo y al 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 marca, por ejemplo, con un pigmento, con un isótopo radiactivo o con una fracción reactiva o catalíticamente activa. A continuación, se

5 mide la cantidad de anticuerpo marcado unida al analito mediante un método apropiado. La composición general y procedimientos que implican los «ensayos de tipo sándwich» se encuentran bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia. (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3a ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol. 10(1):4-10, febrero de 2006. PMID: 16376134).

10 En una realización particularmente preferente, el ensayo comprende los dos anticuerpos según la presente invención, ambos presentes en forma de dispersión en una mezcla de reacción líquida, en la que un primer componente de marcaje se une al primer anticuerpo, en el que el primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la inhibición o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une al segundo anticuerpo, de manera que tras la unión de ambos anticuerpos 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.

15 Todavía más preferentemente, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierra rara o quelatos de tierra rara en combinación con un pigmento fluorescente o pigmento quimioluminiscente, en particular un pigmento del tipo cianina.

20 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en la fluorescencia comprenden la utilización de pigmentos, que pueden, por ejemplo, seleccionarse de entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), 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-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), rodamina, verde rodamina, rojo rodamina, rodamina 110, pigmentos BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde Oregon, coumarinas, tales como umbeliferona, bencimidaz, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, pigmentos de acridinio, pigmentos carbazol, pigmentos fenoxazina, pigmentos porfirina, pigmentos polimetina y similares.

30 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en la quimioluminiscencia comprenden la utilización de pigmentos, basados en los principios físicos descritos para los materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4a ed., editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol.15, páginas 518 a 562, incluyendo las referencias en las páginas 551 a 562. Los pigmentos quimioluminiscentes preferentes son ésteres de acridinio.

35 Finalmente, la invención se refiere además a las líneas celulares de hibridoma depositadas en el DSM bajo los números de acceso DSM ACC 2993, DSM ACC2996 y DSM ACC2997. Dichas líneas celulares de hibridoma producen los anticuerpos preferentes de la presente invención dirigidos contra los epítomos N-terminales, en particular 21 a 40 y 25 a 37 de la PCT y han sido creados tal como se explica en el Ejemplo 1.

40 Secuencias

SEC ID nº 1 (secuencia de aminoácidos de la PCT):

```

1   APFRSALESS PADPATLSED EARLLLLAALV QDYVQMKASE LEQEQEREGS
51  SLDSPRSKRC GNLSTCMLGT YTQDFNKFHT FPQTAIGVGA PGKKRDMSSD
101 LERDHRPHVS MPQANAN

```

45 Descripción de los dibujos

50 Fig. 1: representación esquemática de los ensayos (C, D y E) utilizados en comparación con los ensayos existentes (A y B: LIA de PCT de B·R·A·H·M·S y LIA sensible a PCT de B·R·A·H·M·S, respectivamente). Se ilustra la PCT con sus fracciones calcitonina y catacalcina y se muestran los anticuerpos con sus epítomos. A y B: Un anticuerpo está dirigido contra la fracción calcitonina y el otro anticuerpo está dirigido contra la fracción catacalcina de la PCT; C: ensayo en el que un anticuerpo está dirigido contra un epítomo en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 21 a 40 de la PCT y el otro anticuerpo está dirigido contra la fracción catacalcina de la PCT. D, E: ensayo en el que un anticuerpo está dirigido contra un epítomo en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 21 a 40 de la PCT y el otro anticuerpo está dirigido contra la fracción calcitonina de la PCT.

60 Fig. 2: perfiles de inmunoreactividad de la PCT de sueros que contienen PCT fraccionados según tamaño. Se midieron las fracciones en los ensayos A (designación tal como en la fig. 1) y los valores medidos se relacionan con el valor medido máximo para cada ensayo dentro de cada tanda de fraccionamiento. Se muestran las medias + errores estándar (SEM, por sus siglas en inglés).

Fig. 3: perfiles de inmunorreactividad de la PCT de sueros que contienen PCT fraccionados según tamaño. Se midieron las fracciones en los ensayos C y D (paneles A y B, respectivamente; designaciones tal como en la fig. 1) y los valores medidos se relacionan con el valor medido máximo para cada ensayo dentro de cada tanda de fraccionamiento. Se muestran las medias + errores estándar (SEM, por sus siglas en inglés).

Fig. 4: curvas de dosis-respuesta para tres inmunoensayos de tipo sándwich de PCT. Los ensayos se incubaron durante 30 minutos (panel A) o 2 horas (panel B). PCT LIA y PCT LIA sens. corresponden a B·R·A·H·M·S PCT LIA y B·R·A·H·M·S PCT sensitive LIA, respectivamente (designados A y B en la figura 1). FX1G5/anti-Calc. representa el ensayo E.

Fig. 5: secuencia de aminoácidos de la procalcitonina (PCT) (SEC ID nº 1).

Ejemplos

Ejemplo 1:

Materiales y métodos

A. Desarrollo de anticuerpos monoclonales

Se generaron anticuerpos monoclonales contra la PCT mediante inmunización genética siguiendo principalmente el procedimiento descrito (Costagliola et al., J. Immunol. 160:1458-65, 1998). Brevemente, se clonó la secuencia codificante de PCT mediante procedimientos estándares en el vector pcDNAIII (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). En ratones BALB/c se inyectó en el músculo tibial anterior el día 0, 100 mg de pcDNAIII-PCT en sacarosa al 25%. Se repitieron las inyecciones 3 y 6 semanas después. Se obtuvieron muestras de sangre de capilares retrooculares 8 y 11 semanas después de la inmunización inicial y en el momento del sacrificio, que fue tras 18 semanas, momento en el que también se extrajeron los bazo y tiroides. Se fusionaron células de bazo con células de mieloma SP2/0 para generar líneas celulares de hibridoma. Se cribaron las líneas celulares para su capacidad de secretar anticuerpos que se unirían a la PCT humana recombinante inmovilizada (In Vivo GmbH, Hennigsdorf, Alemania). Con este enfoque se generaron líneas celulares secretoras de anticuerpos monoclonales FX7A7 (producido por la línea celular de hibridoma depositada el 4 de junio de 2009 en el DSM bajo el número de acceso DSM ACC2997), FW5H6 (producido por la línea celular de hibridoma depositada el 4 de junio de 2009 en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2996) y FX1G5 (producida por la línea celular de hibridoma depositada el 29 de abril de 2009 en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2993).

B. Mapeado de epítomos

El mapeado de epítomos en la PCT de los tres anticuerpos monoclonales FX7A7, FW5H6 y FX1G5 se llevó a cabo en micromatrices de péptidos mediante procedimientos estándares (JPT GmbH, Berlin, Alemania). La micromatriz de péptidos estaba compuesta de 74 péptidos expresados como escaneos peptídicos solapantes (formato 13/11: 53 péptidos; formato 20/15: 21 péptidos) y que de esta manera cubría la secuencia de PCT entera sobre la superficie de vidrio. Las micromatrices se pretrataron con tampón de bloqueo (Pierce, Superblock; 2 h a temperatura ambiente) seguido de lavados con tampón TBS, pH 8, y agua (3 veces cada uno). Cada micromatriz pretratada se escaneó utilizando un instrumento escaneador Axon Genepix 4000B para el control del fondo (no pudieron detectarse señales). Las micromatrices individuales se incubaron con anticuerpos en tampón de ensayo (concentración final: 60 µg/ml en tampón Pierce Superblock; volumen total de ensayo: 350 µl, tiempo de incubación: 3 h). Las micromatrices se lavaron con tampón TBS, pH 8, seguido de una incubación con anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (anticuerpo antirratón-Dylight-647; Pierce 31015, 1 µg/ml, tiempo de incubación: 45 min). Se llevó a cabo la incubación de control con anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (anticuerpo antirratón-Dylight-647, Pierce 31015, 1 µg/ml, tiempo de incubación: 45 min) en paralelo al experimento descrito. Se escanearon las micromatrices utilizando el instrumento de escaneado Axon Genepix 4000B con los ajustes de longitud de onda apropiados. Para el análisis de los datos se utilizó el paquete de software de reconocimiento de manchas ArrayPro. Para la evaluación de los datos se utilizó la media de las intensidades de las señales (corregidas para el fondo local) de 3 submatrices idénticas en cada imagen de micromatriz.

C. Inmunoensayos

Se configuraron inmunoensayos de tipo sándwich en el formato de quimioluminiscencia/tubo recubierto de la manera siguiente: Ensayo A:

Se utilizó un ensayo de tipo sándwich disponible comercialmente para la PCT (BRAHMS PCT LIA sensitive), que utiliza un anticuerpo dirigido contra la fracción catacalcina de la PCT como fase sólida y un anticuerpo dirigido contra la fracción calcitonina de la PCT como anticuerpo marcado (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania). Como estándares se utilizó PCT recombinante a diversas concentraciones. Para la comparación con el ensayo E (ver posteriormente), se adaptaron las condiciones de incubación a las indicadas para el ensayo E, es decir, muestra

de 50 µl y 200 µl de solución de anticuerpos marcada y se incubó en una reacción de una etapa en tubos de ensayo durante 30 minutos o 2 horas.

Ensayo B:

Se utilizó un ensayo de tipo sándwich disponible comercialmente para la PCT (BRAHMS PCT LIA), que utiliza un anticuerpo dirigido contra la fracción catabólica de la PCT como fase sólida y un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción calcitonina de la PCT como anticuerpo marcado (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania). Como estándares se utilizó PCT recombinante a diversas concentraciones. Para la comparación con el ensayo E (ver posteriormente), se adaptaron las condiciones de incubación a las indicadas para el ensayo E, es decir, muestra de 50 µl y 200 µl de solución de anticuerpos marcada y se incubó en una reacción de una etapa en tubos de ensayo durante 30 minutos o 2 horas.

Para los demás ensayos se generaron los componentes del ensayo de la manera siguiente:

Marcaje de los anticuerpos

El marcaje del anticuerpo FX1G5 se llevó a cabo mediante procedimientos estándares (patentes nºEP 1488209 y nº EP 1738178): Se ajustó la concentración del anticuerpo purificado a 1 g/l y el anticuerpo se marcó mediante incubación con el marcaje quimioluminiscente MACN-NHS-éster de acridinio (1 g/l, InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) en una proporción molar 1:5 durante 20 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante la adición de 1/10 volumen de glicina 50 mmoles/l durante 10 min a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se separó el marcaje libre mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna NAP-5 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna de HPLC Bio-Sil® SEC-400-5 (BIO-RAD).

Recubrimiento de anticuerpos

El recubrimiento de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción calcitonina de la PCT (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania) se llevó a cabo mediante procedimientos estándares (patentes nº EP 1488209 y nº EP 1738178): Se recubrieron los tubos de partida de poliestireno (Greiner) con anticuerpo purificado (por cada tubo, 2 µg de anticuerpo en 300 µl de Tris 10 mmoles/l, NaCl 100 mmoles/l, pH 7,8) durante la noche a 22°C. A continuación, los tubos se bloquearon con fosfato sódico 10 mmoles/l (pH 6,5) que contenía 30 g/l de Karion FP (Merck), 5 g/l de albúmina de suero bovino libre de proteasas (Sigma) y se liofilizaron.

Con dichos componentes se prepararon los ensayos siguientes.

Ensayo C:

Los tubos recubiertos con un anticuerpo anticatabólica y estándares (PCT recombinante) se obtuvieron del ensayo B.R.A.H.M.S. PCT LIA sensitive (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania). Como anticuerpo marcado se utilizó el anticuerpo FX1G5 marcado con MACN. El tampón de ensayo era fosfato de potasio 300 mmoles/l, pH 7,0, NaCl 100 mmoles/l, EDTA 10 mmoles/l, azida sódica 0,9 g/l, albúmina de suero bovino libre de proteasas 5 g/l (Sigma), IgG bovina no específica 1 g/l, IgG de oveja no específica 1 g/l, IgG de ratón no específica 1 g/l y contenía 2×10^6 unidades luminicas relativas (ULR) de anticuerpo marcado con MACN por cada 200 µl. Se pipetearon en los tubos recubiertos 100 µl de estándares o muestras y 200 µl de tampón de ensayo que contenía el anticuerpo marcado con MACN. Los tubos se incubaron durante 2 horas a 22°C bajo agitación. A continuación, los tubos se lavaron 5 veces con 1 ml de solución de lavado B.R.A.H.M.S. (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania) y se midió la quimioluminiscencia unida durante 1 s cada tubo con un luminómetro LB952T (Berthold). Se calcularon las concentraciones de las muestras utilizando el software MultiCalc (Spline Fit).

Ensayo D:

Se utilizaron tubos recubiertos con un anticuerpo anticalcitonina. Se obtuvieron los estándares (PCT recombinantes) del ensayo BRAHMS PCT LIA sensitive (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania). Como anticuerpo marcado se utilizó el anticuerpo FX1G5 marcado con MACN. El tampón de ensayo era fosfato de potasio 300 mmoles/l, pH 7,0, NaCl 100 mmoles/l, EDTA 10 mmoles/l, azida sódica 0,9 g/l, albúmina de suero bovino libre de proteasas 5 g/l (Sigma), IgG bovina no específica 1 g/l, IgG de oveja no específica 1 g/l, IgG de ratón no específica 1 g/l y contenía 2×10^6 unidades luminicas relativas (ULR) de anticuerpo marcado con MACN por cada 200 µl. Se pipetearon en los tubos recubiertos 100 µl de estándares o muestras y 200 µl de tampón de ensayo que contenía el anticuerpo marcado con MACN. Los tubos se incubaron durante 2 horas a 22°C bajo agitación. A continuación, los tubos se lavaron 5 veces con 1 ml de solución de lavado B.R.A.H.M.S. (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania) y se midió la quimioluminiscencia unida durante 1 s cada tubo con un luminómetro LB952T (Berthold). Se calcularon las concentraciones de las muestras utilizando el software MultiCalc (Spline Fit).

Ensayo E:

Se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpo FX1G5. Se obtuvieron los estándares (PCT recombinante) y anticuerpo policlonal marcado anticalcitonina a partir del ensayo BRAHMS PCT LIA (BRAHMS AG, Henningsdorf, Alemania). Se pipetearon en los tubos recubiertos 50 µl de estándares o muestras y 200 µl de tampón de ensayo que contenía el anticuerpo marcado con MACN. Los tubos se incubaron durante 30 minutos o durante 2 horas a 22°C bajo agitación. A continuación, los tubos se lavaron 5 veces con 1 ml de solución de lavado B.R.A.H.M.S. (B.R.A.H.M.S. AG, Henningsdorf, Alemania) y se midió la quimioluminiscencia unida durante 1 s cada tubo con un luminómetro LB952T (Berthold).

D. Cromatografía de exclusión por tamaño

Se fraccionaron muestras de plasma procedentes de nueve pacientes con concentraciones elevadas de PCT (incluyendo pacientes con sepsis) utilizando una columna de HPLC Bio-Sil® SEC-125-5 (BIO-RAD). El volumen de muestra era de 100 µl. El tampón de migración era PBS, pH 7,4. El caudal era de 0,8 ml/min. Se recolectaron fracciones de 0,4 ml, medidas en los ensayos A, C y D. Se utilizaron los péptidos siguientes a modo de calibradores: PCT recombinante (PM=aprox. 13 kDa; In Vivo GmbH, Henningsdorf, Alemania), preproADM 45-92 (secuencia ELRMSS SYPTGLADVK AGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RV; PM=5,1 kDa; JPT GmbH, Berlin, Alemania), vitamina B12 (PM: 1,3 kDa). La PCT recombinante y preproADM 45-92 se resolvieron en una matriz estándar obtenida de los ensayos BRAHMS PCT LIA sensitive y BRAHMS MR-proADM LIA (BRAMHS AG, Henningsdorf, Alemania) y se determinaron sus perfiles de elución de la HPCL de fraccionamiento por tamaño utilizando dichos ensayos. Se diluyó vitamina B12 en tampón de migración y se sometió a cromatografía; se registró la absorción a 280 nm.

E. Medición de las muestras

Se midieron treinta muestras de suero de pacientes con infecciones bacterianas locales, sepsis o choque séptico en los ensayos A, C y D.

ResultadosAnticuerpos monoclonales

Se generaron tres anticuerpos monoclonales de ratón mediante inmunización genética utilizando la secuencia codificante completa de la PCT. El mapeado de epítomos reveló resultados similares aunque no idénticos para los tres anticuerpos (Tabla 2). Los anticuerpos FW5H6 y FX7A7 mostraron una unión máxima al péptido EARLLLAALVQDYVQMKASE (pos. 21-40 dentro de la PCT) y para el anticuerpo FX1G5 se observó unión máxima en un péptido derivado del anterior, es decir, LLAALVQDYVQMK (pos. 25-37). Fuera de dichas regiones, no se identificaron otros sitios de unión significativos dentro de la secuencia de PCT para los tres anticuerpos. El método de inmunización utilizado aquí es únicamente un ejemplo. Otros métodos son bien conocidos, que podrían aplicarse alternativamente a la generación de anticuerpos contra un epítomo en las regiones descritas y más generalmente cadena arriba de la posición 53, por ejemplo, podrían utilizarse como antígeno, péptidos de síntesis química conjugados con una proteína portadora.

Cromatografía de exclusión por tamaño

El peso molecular aparente de la PCT nativa y la detectabilidad con diversos inmunoensayos de tipo sándwich se evaluó mediante fraccionamiento de muestras de suero procedentes de pacientes con concentraciones elevadas de PCT nativa (incluyendo pacientes con sepsis) utilizando HPLC de exclusión por tamaño. Se observó esencialmente el mismo perfil de inmunorreactividad, con independencia de si las fracciones se habían medido con el ensayo A, C o D (fig. 1). El tiempo de elución de la PCT nativa era indistinguible del de la PCT recombinante (figs. 2 y 3). Prácticamente no se detectó inmunorreactividad de la PCT correspondiente a un peso molecular inferior a 13 kDa mediante cualquiera de los tres ensayos. Más notablemente, no se detectó inmunorreactividad de la PCT correspondiente a un peso molecular de aprox. 6 kDa mediante el ensayo A; ello sería esperable en el caso de que las premisas del estado de la técnica fueran correctas: es decir, la PCT puede dividirse inmediatamente cadena arriba de la fracción calcitonina de la PCT. Estos resultados demuestran que, al contrario que las especulaciones del estado de la técnica, en pacientes con concentraciones elevadas de PCT (excluyendo el carcinoma medular de tiroides) la PCT no resulta detectablemente cortada en el medio de la molécula y que los inmunoensayos de tipo sándwich del tipo A, C o D detectan el mismo antígeno.

Medición de las muestras

Se midieron treinta muestras de suero de pacientes con infecciones bacterianas locales, sepsis o choque séptico en los ensayos A, C y D. Los coeficientes de correlación de Spearman fueron los siguientes: Ensayo A vs. C: $r=0,9893$; Ensayo A vs. D: $r=0,9844$. Estos coeficientes de correlación ideales derivados de la medición de un número significativo de muestras de pacientes con infecciones de diversos grados de gravedad claramente confirman los

resultados obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño, de manera que debe concluirse de manera general que la PCT, en caso de encontrarse a nivel más elevado del normal (excluyendo el carcinoma medular de tiroides) no resultada cortada en el medio de la molécula.

5 Características de ensayo

10 La utilización de uno de los anticuerpos indicados en la presente memoria, FX1G5, con un epítipo correspondiente a las posiciones 25 a 37 de la PCT, en un ensayo de tipo sándwich que utiliza un anticuerpo anticalcitonina como segundo anticuerpo (ensayo E) se analizó en comparación con los ensayos de PCT del estado de la técnica, los cuales utilizan la misma tecnología de detección (tubo recubierto/marcaje de quimioluminiscencia), es decir, BRAHMS PCT LIA sensitive (ensayo A) y BRAHMS PCT LIA (ensayo B). Inesperadamente, el ensayo E mostró curvas de dosis-respuesta considerablemente más dinámicas que ambos ensayos establecidos, con independencia del tiempo de incubación (fig. 4).

15 **Tabla 1: anticuerpos anti-PCT descritos y utilización de los mismos en inmunoensayos**

Nombre	Proveedor	Inmunógeno (los números se refieren a las posiciones aminoácidas en PCT 1-116)	Epítipo (los números se refieren a las posiciones aminoácidas en PCT 1-116)	Sometido a ensayo en inmunoensayo de tipo sándwich	Sometido a ensayo con PCT nativa	Referencia
anticalcitonina	oveja	calcitonina	GYTQDFNKFH; 69-79	sí	sí	(Morgenthaler et al., Clin. Chem. 48:788-90, 2002).
Anticatalcina (QN05)	ratón	catacalcina	ERDHRPHVSM; 102-111	sí	sí	(Morgenthaler et al., Clin. Chem. 48:788-90, 2002).
PROC1 3G3	rata	FRSALESSPADP ATL SEDE; 3-20	n.d.	sí	no	(Kramer et al., Anal. Bioanal. Chem. 392:727-36, 2008)
PROC4 6C6 etc	rata	SDLERDHRPHV; 99-109	n.d.	sí	no	(Kramer et al., Anal. Bioanal. Chem. 392:727-36, 2008)
Antisuero R2B7	conejo	Amino-ProCT; 1-57	n.d.	no	sí	(Whang et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 83:3296-301, 1998)
295/3H12 etc.	ratón	APFRLSALESC; 1-9	n.d. aparte de la necesidad de alanina N-terminal	sí	sí	DE 10 2007 009 751
98/-47/44	ratón	DSPRSKRCGNLS; 53-64	n.d.	sí	sí	US 6451311
98/-31/04	ratón	VGAPGKKRDMS S; 88-99	n.d.	sí	sí	US 6451311
CT08,	ratón	calcitonina	TYTQDFN; 70-76	sí	sí	(Assicot et al., Lancet 341:515-8, 1993; Ghillani et al., Cancer Res. 49:6845-51, 1989)
KC01	ratón	catacalcina	DMSSDLERDHR; 96-106	sí	sí	(Assicot et al., Lancet 341:515-8, 1993; Ghillani et al., Cancer Res. 49:6845-51, 1989)

ES 2 666 332 T3

Tabla 2: resultados del mapeado de epítomos: Las señales de unión observadas para los tres anticuerpos con los péptidos mostrados que representan subsecuencias de la secuencia completa de PCT se relacionaron con la unión máxima obtenida para cada anticuerpo (B/Bmax).

Nº de péptido	secuencia	FX1G5	FW5H6	FX7A7
1	APFRSALESSPAD	0,0%	0,0%	0,0%
2	FRSALESSPADPA	0,0%	0,0%	0,0%
3	SALESSPADPATL	0,0%	0,0%	0,0%
4	LESSPADPATLSE	0,0%	0,0%	0,0%
5	SSPADPATLSEDE	0,0%	0,0%	0,0%
6	PADPATLSEDEAR	0,0%	0,0%	0,0%
7	DPATLSEDEARLL	0,0%	0,0%	0,0%
8	ATLSEDEARLLLA	0,0%	0,1%	0,0%
9	LSEDEARLLLAAL	3,0%	0,0%	0,0%
10	EDEARLLLAALVQ	0,3%	0,0%	0,0%
11	EARLLLAALVQDY	1,7%	0,0%	0,0%
12	RLLLAALVQDYVQ	25,0%	57,3%	0,2%
13	LLAALVQDYVQMK	100,0%	59,5%	62,7%
14	AALVQDYVQMKAS	11,9%	14,7%	0,0%
15	LVQDYVQMKASEL	0,0%	0,0%	0,0%
16	QDYVQMKASELEQ	0,0%	0,0%	0,0%
17	YVQMKASELEQEQ	0,0%	0,0%	0,0%
18	QMKASELEQEQER	0,0%	0,0%	0,0%
19	KASELEQEQEREG	0,0%	0,0%	0,0%
20	SELEQEQEREGSS	0,0%	0,0%	0,0%
21	LEQEQEREGSSLD	0,0%	0,1%	0,0%
22	QEQEREGSSLDSP	0,0%	0,0%	0,0%
23	QEREGSSLDSPRS	0,0%	0,0%	0,0%
24	REGSSLDSPRSKR	0,0%	0,1%	0,0%
25	GSSLDSPRSKRCG	0,0%	0,3%	0,1%
26	SLDSPRSKRCGNL	0,0%	0,2%	0,3%
27	DSPRSRSKRCGNLST	0,0%	0,0%	0,2%
28	PRSKRCGNLSTCM	0,0%	0,0%	0,2%
29	SKRCGNLSTCMLG	0,0%	0,0%	0,0%
30	RCGNLSTCMLGTY	0,0%	0,0%	0,2%
31	GNLSTCMLGTYTQ	0,1%	0,0%	0,0%
32	LSTCMLGTYTQDF	0,0%	0,0%	0,0%
33	TCMLGTYTQDFNK	0,0%	0,0%	0,0%
34	MLGTYTQDFNKFH	0,0%	3,4%	0,0%
35	GTYTQDFNKFHTF	0,0%	1,9%	0,0%
36	YTQDFNKFHTFPQ	0,0%	0,1%	0,0%
37	QDFNKFHTFPQTA	0,4%	0,0%	0,0%
38	FNKFHTFPQTAIG	0,0%	0,1%	0,0%
39	KFHTFPQTAIGVG	0,2%	0,0%	0,0%
40	HTFPQTAIGVGAP	0,0%	0,0%	0,0%
41	FPQTAIGVGAPGK	0,1%	0,0%	0,0%
42	QTAIGVGAPGKKR	1,0%	0,1%	0,1%
43	AIGVGAPGKKRDM	0,0%	0,0%	0,0%
44	VGAPGKKRDMSS	0,0%	0,0%	0,0%
45	GAPGKKRDMSSDL	0,0%	0,6%	0,0%
46	PGKKRDMSSDLER	0,0%	0,3%	0,1%
47	KKRDMSSDLERDH	0,0%	0,0%	0,0%
48	RDMSSDLERDHRP	0,0%	1,5%	0,0%
49	MSSDLERDHRPHV	1,8%	1,5%	1,9%
50	SDLERDHRPHVSM	0,4%	1,5%	0,9%
51	LERDHRPHVSMPQ	1,3%	1,5%	2,8%
52	RDHRPHVSMPQNA	0,0%	0,1%	0,2%
53	DHRPHVSMPQNaN	0,0%	0,0%	0,0%
54	APFRSALESSPADPATLSED	0,2%	0,0%	0,0%
55	ALESSPADPATLSEDEARLL	0,3%	0,1%	0,0%
56	PADPATLSEDEARLLLAALV	0,0%	0,0%	0,0%

ES 2 666 332 T3

57	TLSEDEARLLLAALVQDYVQ	64,4%	64,7%	49,9%
58	EARLLLAALVQDYVQMKASE	74,6%	100,0%	100,0%
59	LAALVQDYVQMKASELEQEQ	2,8%	2,7%	0,1%
60	QDYVQMKASELEQEQEREGS	0,7%	0,0%	0,1%
61	MKASELEQEQEREGSSLDSP	0,6%	0,0%	0,1%
62	LEQEQEREGSSLDSPRSKRC	0,0%	0,4%	0,1%
63	EREGSSLDSPRSKRCGNLST	0,0%	0,2%	0,0%
64	SLDSPRSKRCGNLSTCMLGT	0,5%	0,0%	0,0%
65	RSKRCGNLSTCMLGTYTQDF	0,9%	0,2%	0,0%
66	GNLSTCMLGTYTQDFNKFHT	0,0%	0,5%	0,0%
67	CMLGTYTQDFNKFHTFPQTA	0,0%	0,1%	0,0%
68	YTQDFNKFHTFPQTAIGVGA	0,0%	0,0%	0,0%
69	NKFHTFPQTAIGVGAPGKKR	4,8%	0,3%	0,9%
70	FPQTAIGVGAPGKKRDMSSD	0,0%	0,0%	0,0%
71	IGVGAPGKKRDMSSDLERDH	0,0%	0,1%	0,0%
72	PGKKRDMSSDLERDHRPHVS	0,7%	0,1%	2,3%
73	DMSSDLERDHRPHVSMPQNA	0,2%	0,1%	0,3%
74	MSSDLERDHRPHVSMPQNaN	0,3%	0,4%	0,2%

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft
- <120> Inmunoensayo para la detección de procalcitonina
- <130> B60441PCT
- 10 <150> EP 09 158 983.8
<151> 2009-04-28
- <150> EP 09 165 227.1
<151> 2009-07-10
- 15 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 25 <400> 1

ES 2 666 332 T3

Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr
1 5 10 15

Leu Ser Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Gln Asp
20 25 30

Tyr Val Gln Met Lys Ala Ser Glu Leu Glu Gln Glu Gln Glu Arg Glu
35 40 45

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Pro Arg Ser Lys Arg Cys Gly Asn Leu Ser
50 55 60

Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr
65 70 75 80

Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp
85 90 95

Met Ser Ser Asp Leu Glu Arg Asp His Arg Pro His Val Ser Met Pro
100 105 110

Gln Asn Ala Asn
115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método in vitro para la detección de procalcitonina tal como se define en la SEC ID nº 1 o un fragmento de la misma que comprende los residuos aminoácidos 3 a 116 de SEC ID nº 1 en una muestra biológica derivada de un líquido corporal obtenido de un sujeto, que comprende las etapas de:
- 10 a. poner en contacto dicha muestra con por lo menos dos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos dirigidos contra diferentes epítomos dentro de la procalcitonina y
- 10 b. detectar cualitativa o cuantitativamente la unión de dichos dos o más anticuerpos a procalcitonina o dicho fragmento de la misma, en el que la unión indica la presencia o concentración de procalcitonina o dicho fragmento en dicha muestra,
- 15 en el que por lo menos un anticuerpo o fragmento funcional del mismo está dirigido contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 25 a 37 de la procalcitonina, en el que el anticuerpo es producido por una línea celular de hibridoma que se encuentra depositada en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2993 y en el que otro anticuerpo o fragmento funcional del mismo está dirigido contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 96 a 116 de la procalcitonina o un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 60 a 91 de la procalcitonina y en el que dicho otro anticuerpo o fragmento funcional del mismo es un anticuerpo monoclonal.
- 20 2. Anticuerpo o un fragmento funcional del mismo contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 25 a 37 de la procalcitonina, en el que el anticuerpo es producido por una línea celular de hibridoma que se encuentra depositada en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2993.
- 25 3. Kit que comprende por lo menos:
- 30 a. un primer anticuerpo o un fragmento funcional del mismo dirigido contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 25 a 37 de la procalcitonina, en el que el anticuerpo es producido por una línea celular de hibridoma que se encuentra depositada en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2993 y
- 30 b. un segundo anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, dirigido contra un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 96 a 116 de la procalcitonina o un epítomo comprendido en la secuencia que comprende los residuos aminoácidos 60 a 91 de la procalcitonina.
- 35 4. Utilización de un kit según la reivindicación 3 en un inmunoensayo de tipo sándwich para la detección y/o cuantificación in vitro de la procalcitonina tal como se define en la SEC ID nº 1 o un fragmento de la misma que comprende los residuos aminoácidos 3 a 116 de la SEC ID nº 1 en una muestra biológica procedente de un líquido corporal.
- 40 5. Utilización del método según la reivindicación 1, el anticuerpo según la reivindicación 2 o el kit según la reivindicación 3 para la determinación in vitro de la presencia o ausencia de procalcitonina o un fragmento de la misma o para la cuantificación de procalcitonina o un fragmento de la misma en una muestra biológica procedente de un líquido corporal.
- 45 6. Utilización según la reivindicación 5 para el diagnóstico in vitro, prognosis, estratificación de riesgos, seguimiento de la terapia, guía a la terapia o estratificación para la aplicación de medidas terapéuticas de una enfermedad o condición asociada a niveles elevados de procalcitonina.
- 50 7. Utilización según la reivindicación 6, en la que la enfermedad o condición se selecciona de entre el grupo de las infecciones bacterianas locales, sepsis, sepsis severa, choque séptico, enfermedad no infecciosa, incluyendo las enfermedades cardiovasculares (síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis o ictus), cáncer, diabetes, enfermedades gastrointestinales crónicas, enfermedades renales crónicas, hipertensión, enfermedades ortopédicas, incluyendo la osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.
- 55 8. Línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2993.

Fig. 1

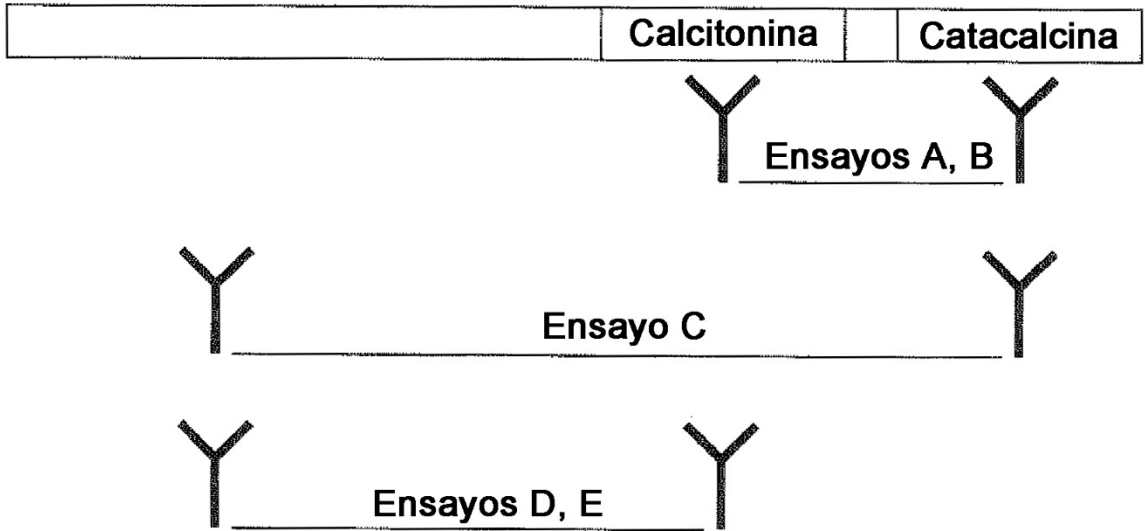


Fig. 2

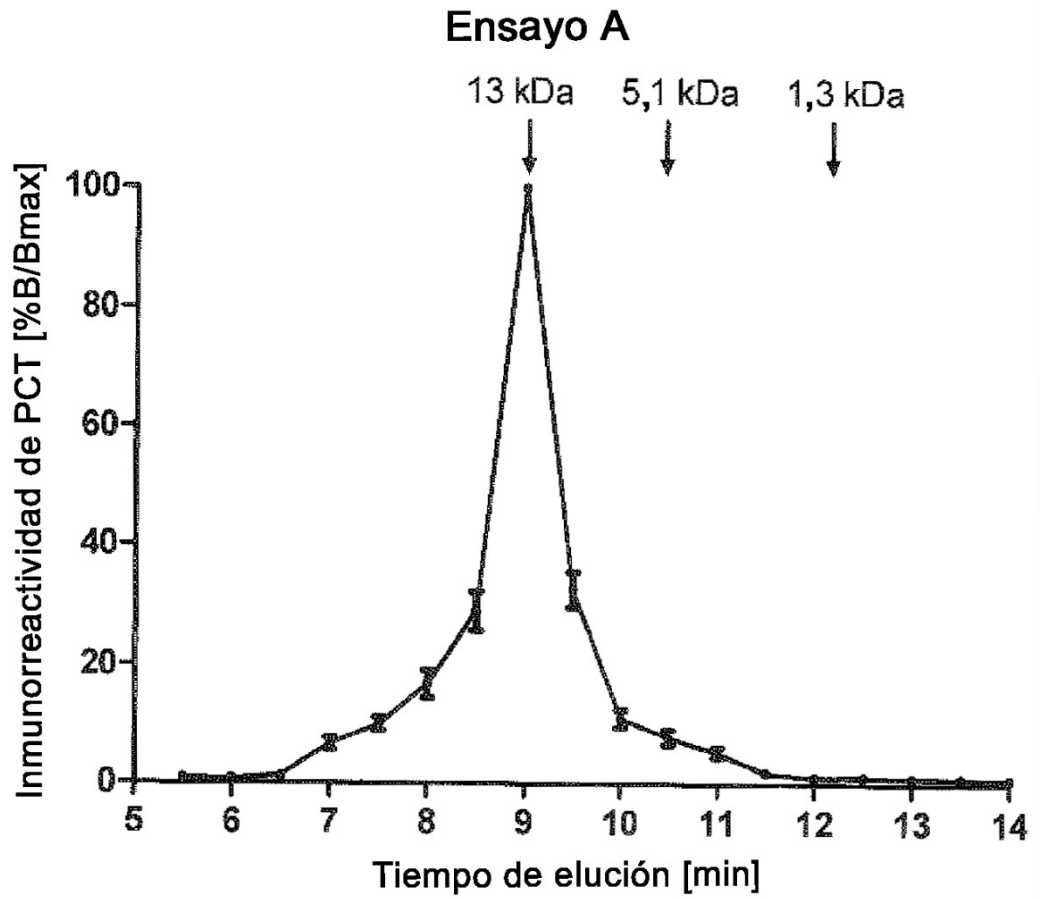


Fig. 3

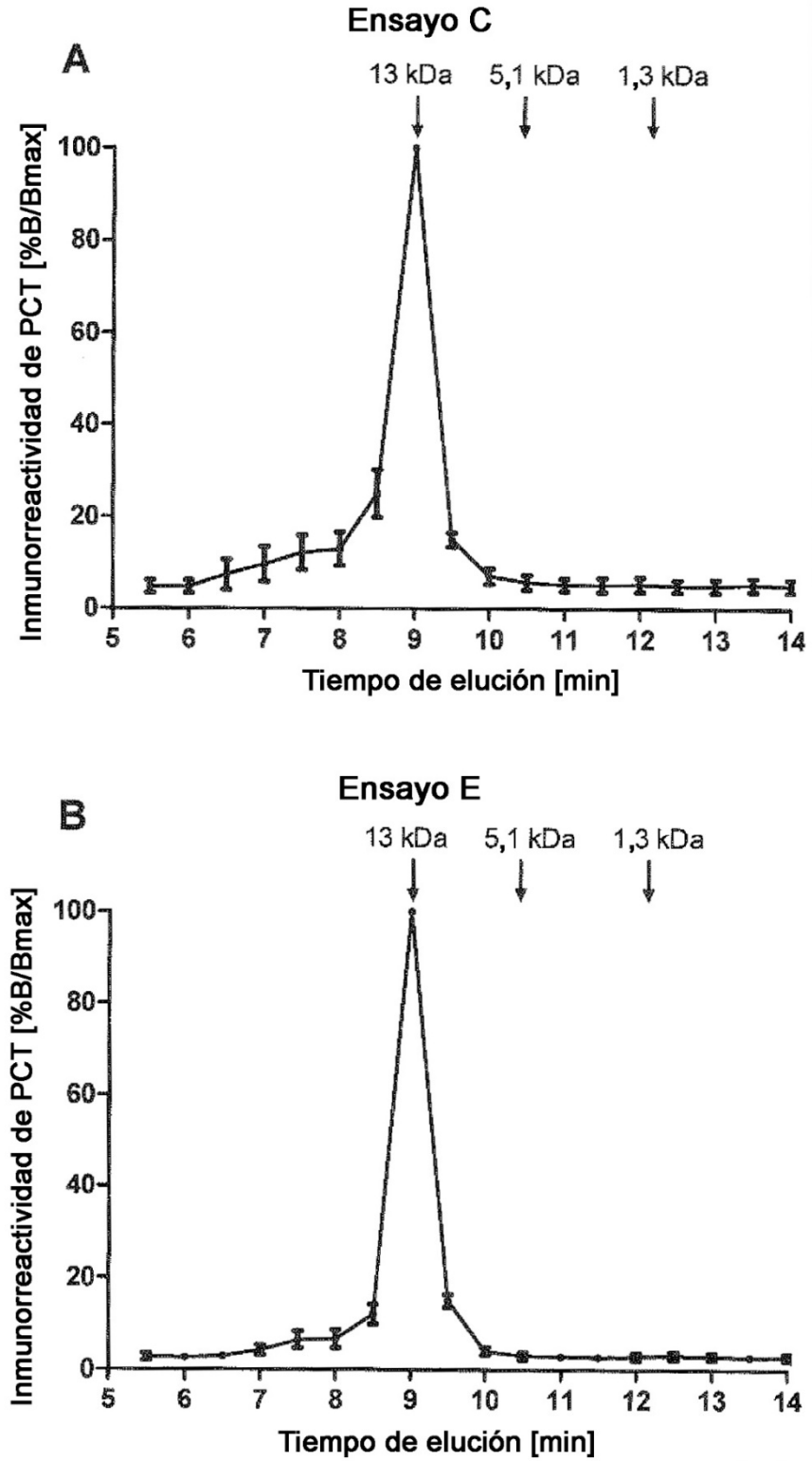


Fig. 4

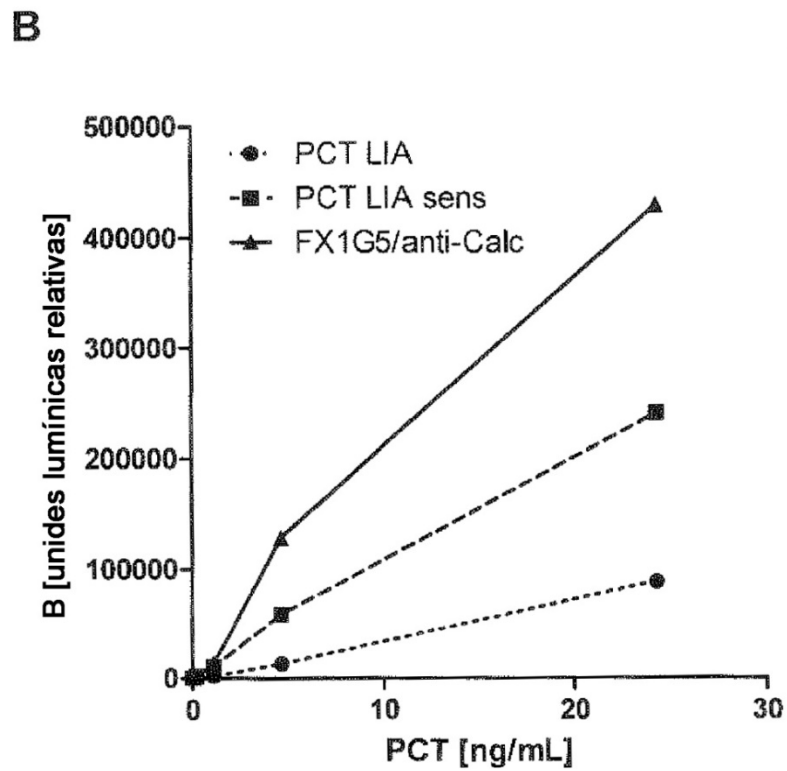
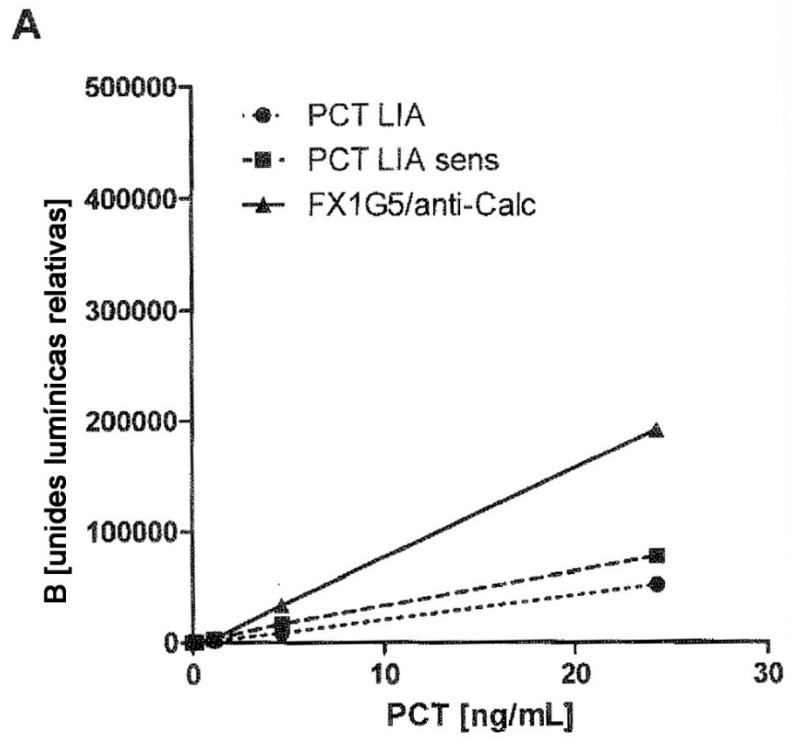


Fig. 5

SEC ID n° 1

```
1    APFRSALESS PADPATLSED EARLLLLAALV QDYVQMKASE LEQEQEREGS
51   SLDSPRSKRC GNLSTCMLGT YTQDFNKFHT FPQTAIGVGA PGKKRDMSSD
101  LERDHRPHVS MPQAN
```