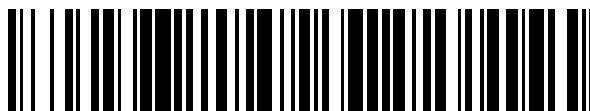


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 545**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2003 E 15203244 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3061769**

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

30 Prioridad:

18.11.2002 US 300733

04.02.2003 US 359051

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

05.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 688 545 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo ELISA policlonal-monoclonal para detectar proBNP N-Terminal

5 Campo de la invención:

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

Antecedentes de la invención:

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

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

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

Muchos estudios han demostrado la utilidad clínica de medir las concentraciones plasmáticas de NP, incluido NT-proBNP. Se han sugerido los NP como los biomarcadores de elección para el diagnóstico y la estratificación del riesgo de pacientes con insuficiencia cardíaca (Clerico A, Del Ry S y Giannessi D. Measurement Of Cardiac Natriuretic Hormones (Atrial Natriuretic Peptide, Brain Natriuretic Peptide, And Related Peptides) In Clinical Practice: The Need For A New Generation Of Immunoassay Methods. Clin Chem 2000; 46:1529-1534; Mair J, Hammerer-Lercher A y Puschendorf B. The Impact Of Cardiac Natriuretic Peptide Determination On The Diagnosis And Management Of Heart Failure. Clin Chem Lab Med 2001; 39:571-588; Sagnella GA. Measurement And Importance Of Plasma Brain Natriuretic Peptide And Related Peptides. Ann Clin Biochem 2001; 38:83-93; Selvais PL, Donckier JE, Robert A, Laloux O, van Linden F, Ahn S, Ketelslegers JM y Rousseau MF. Cardiac Natriuretic Peptides For Diagnosis And Risk Stratification In Heart Failure: Influences Of Left Ventricular Dysfunction And Coronary Artery Disease On Cardiac Hormonal Activation. Eur J Clin Invest 1998; 28:636-642; McDonagh TA, Cunningham AD, Morrison CE, McMurray JJ, Ford I, Morton JJ y Dargie HJ. Left Ventricular Dysfunction, Natriuretic Peptides, And Mortality In Urban Population. Heart 2001; 86:21-26). Varios estudios han demostrado la utilidad de usar mediciones de NP para identificar pacientes con disfunción ventricular izquierda, incluso entre pacientes que son asintomáticos (es decir clase I de la NYHA) y se ha sugerido que las mediciones de NP como herramienta de tamizaje pueden ayudar con alta eficacia a los pacientes objetivo dentro de los grupos de alto riesgo de insuficiencia cardíaca (por ejemplo enfermedad arterial coronaria, hipertensión, diabetes, personas de edad avanzada) quienes requerirán evaluación y tratamiento de seguimiento (Hughes D, Talwar S, Squire IB, Davies JE y Ng LL. An Immunoluminometric Assay For N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide: Development Of A Test For Left Ventricular Dysfunction. Clin Sci 1999; 96:373-80; Omland T, Aakvaag A, Vik-Mo H. Plasma Cardiac Natriuretic Peptide Determination As A Screening Test For The Detection Of Patients With Mild Left Ventricular Impairment. Heart 1996; 76:232-237; McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, y otros. Biochemical Detection Of Left-Ventricular systolic Dysfunction. Lancet 1998; 351:9-13; Schulz H, Langvik TA, Lund Sagen E, Smith J, Ahmadi N y Hall C. Radioimmunoassay For N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide In Human Plasma. Scand J Clin Lab Invest 2001; 61:33-42; Talwar S, Squire IB, Davies JE, Barnett DB y Ng LL. Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide And The ECG In The Assessment Of Left-Ventricular Systolic Dysfunction In A High Risk Population. Eur Heart J 1999; 20:1736-1744; Hystad ME, Geiran OR, Attramadal H, Spurkland A, Vege A, Simonsen S y Hall C. Regional Cardiac Expression And Concentration Of Natriuretic Peptides In Patients With Severe Chronic Heart Failure. Acta Physiol Scand 2001; 171:395-403; Hobbs FDR, Davis RC, Roalfe AK, Hare R, Davies MK y Kenkre JE. Reliability Of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Assay In Diagnosis Of Heart Failure: Cohort Study In Representative And High Risk Community Populations. BMJ 2002; 324:1498). Se ha demostrado que los NP tienen un buen valor pronóstico con respecto a la morbilidad y la

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

Técnica anterior:

El documento WO 93/24531 (la Patente de Estados Unidos núm. 5,786,163) de Hall describe un método inmunológico para identificar proBNP N-terminal y los anticuerpos usados para este. Para obtener estos anticuerpos, se usan péptidos únicos producidos sintéticamente a partir de la secuencia del proBNP N-terminal. La producción de anticuerpos por medio de la inmunización con péptidos es posible en principio, pero la afinidad con respecto a la molécula completa generalmente es demasiado baja para alcanzar la sensibilidad necesaria en un procedimiento de prueba. Además, existe el peligro de que al usar péptidos los anticuerpos obtenidos puedan, por ejemplo, identificar el extremo C del péptido y, por lo tanto, solo se pueden unir a este fragmento de la molécula completa, lo que resulta así en anticuerpos que generalmente no se pueden unir a toda la molécula, o puede hacerlo solo de forma limitada. En el documento WO 93/24531 se produce un anticuerpo contra un único péptido derivado del proBNP N-terminal. Se demuestra que los anticuerpos producidos se unen al péptido de inmunización (aminoácidos 47-64) en el formato de prueba competitivo. Sin embargo, no se muestra que los anticuerpos sean capaces de unirse al proBNP N-terminal nativo como una molécula completa en una muestra. Además, la prueba en sandwich descrita en el documento WO 93/24531 en una muestra no puede realizarse como se describe ya que no había material estándar apropiado y no había anticuerpos contra dos epítomos diferentes. Además, la prueba competitiva realizada en el documento PCT 93/24531, donde el péptido 47-64 compite en una forma marcada como trazador con una muestra o el péptido no marcado estándar 47-64 para unirse a anticuerpos policlonales de suero de conejo, adolece del hecho de que solo se alcanza una competencia muy moderada después de 48 horas de incubación, de las cuales pueden derivarse solo un límite de detección bajo de aprox. 250 fmol/ml. Esto no es suficiente para la diferenciación de individuos sanos y pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca ni para una clasificación diferenciada de muestras de pacientes en los grados de severidad de la insuficiencia cardíaca. Además, los largos tiempos de incubación de la prueba competitiva no son aceptables para las mediciones rutinarias de las muestras en laboratorios automatizados.

Hunt y otros. (Clinical Endocrinology 47 (1997),287-296) además describe una prueba competitiva para la detección del proBNP N-terminal. Para esto es necesaria la extracción compleja de la muestra de plasma antes de la medición; esto puede conducir a la destrucción del analito y error de las mediciones. El antisuero usado se produce análogamente al documento WO 93/24531 por inmunización con un péptido sintético- Hunt y otros produjeron el antisuero por inmunización con los aminoácidos 1-13 de proBNP N-terminal y el péptido de aminoácidos 1-21 se usa como un estándar. Para esta prueba, además son necesarios también largos tiempos de incubación. Después de una incubación de 24 horas, se alcanza un límite de detección más bajo de 1,3 fmol/ml.

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

El documento WO 00/35951, Natriuretic Peptide Fragments, se refiere a un ensayo para NT-proBNP que utiliza dos anticuerpos dirigidos hacia diferentes epítomos de la secuencia de NT-proBNP. Este ensayo adolece de deficiencias similares a las de Hall (5.786.163) en que los anticuerpos se generan contra fragmentos de péptidos sintéticos como el inmunógeno.

Resumen de la invención:

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Cualquier materia que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención, sino que solo sirve como información de referencia para comprender mejor la invención.

5 El estuche de prueba y ensayo ELISA de proteína NT-proBNP descrito al instante es un ensayo *in vitro* específico y sensible que es capaz de medir la concentración de NT-proBNP en una variedad de fluidos corporales, ejemplos no limitantes de los cuales son sangre, suero, plasma, orina y similares. Los siguientes ejemplos y descripciones ejemplificarán el uso del ensayo en plasma humano.

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

15 La prueba del ensayo ELISA de NT-proBNP emplea la técnica de ELISA sandwich para medir NT-proBNP circulante en plasma humano. Para obtener anticuerpos con propiedades de unión específicas para las secuencias de aminoácidos objetivo dentro del proBNP humano, se expresó y purificó proBNP humano recombinante (o rhproBNP) para usar como un inmunógeno. Los anticuerpos policlonales (PAb) específicos para las secuencias de aminoácidos dentro del proBNP (1-25, 26-51, 52-76 o 77-108) de la sec. con núm. de ident.: 1 se purificaron posteriormente a partir de suero de cabra
20 mediante purificación de afinidad secuencial para obtener material para su uso en la calibración de un método cuantitativo para la medición de NT-proBNP humano, se expresó y purificó NT-proBNP humano recombinante (o rhNT-proBNP). Los monoclonales se produjeron a partir de sobrenadantes para su uso en un ELISA de NT-proBNP al emparejar con los anticuerpos policlonales de cabra descritos al instante. Los monoclonales se biotinilaron y se usaron como un anticuerpo detector para unirse a la proteína NT-proBNP unida al anticuerpo de captura anti-NT-proBNP, formando así un sandwich.

25 Como consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos policlonales de cabra generados contra proBNP humano recombinante, cuyos anticuerpos se seleccionan específicamente para exhibir una afinidad específica por secuencias de aminoácidos objetivo dentro del proBNP humano.

30 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un método cuantitativo para la medición de NT-proBNP humano, mediante el cual puede determinarse una herramienta de diagnóstico/tamizaje para predecir con exactitud la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva.

35 Todavía es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar anticuerpos monoclonales útiles para proporcionar un ensayo de diagnóstico *in vitro* particularmente sensible y específico cuando se combinan con los anticuerpos policlonales de cabra seleccionados previamente.

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

40 Breve descripción de las figuras:

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

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

La Figura 3 es un diagrama de caja de los niveles de NT-proBNP en Clase III y IV de la NYHA contra los controles;

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

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

50 Descripción detallada de la invención:

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

contra la concentración de NT-proBNP a partir de la cual pueden calcularse las concentraciones de NT-proBNP en muestras de ensayo y controles. Se entiende que la detección de la inmunorreacción puede realizarse a través de métodos directos o indirectos que son bien conocidos en la técnica.

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

Producción y purificación de anticuerpos policlonales:

20 Se inmunizaron cabras (raza La Mancha o Toggenburg) con proBNP de longitud completa humano recombinante purificado (rhproBNP). Se administró una inyección intramuscular primaria de 500 µg de rhproBNP purificado emulsionado en adyuvante completo de Freund en sitios múltiples, seguido de inyecciones intramusculares de 250 µg de rhproBNP purificado emulsionado en adyuvante incompleto de Freund cada dos semanas en sitios múltiples. El título de las cabras inmunizadas se controló rutinariamente mediante el tamizaje del suero por medio del uso de una técnica ELISA medio sandwich.

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

35 1. IgG humana (Jackson ImmunoResearch)
2. IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch)
3. secuencia de aminoácidos de proBNP #1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1 (H P L G S P G 8 A S D L B T S G L Q E Q R N H L Q) acoplado a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)

O

40 3. secuencia de aminoácidos de proBNP #26-51 de sec. con núm. de ident.: 1 (G K L S E L Q V E Q T S L E P L Q E S P R P T G V W) acoplado a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)

O

45 4. secuencia de aminoácidos de proBNP #52-76 de sec. con núm. de ident.: 1 (K S R E V A T E G I R G H R K M V L Y T L R A P R) acoplado a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)

O

50 5. secuencia de aminoácidos de proBNP #77-108 de sec. con núm. de ident.: 1 (BNP-32, S P K M V Q G S G C F G R K M D R I S S S S G L G C K V L R R H) acoplado a hemocianina de lapa californiana (ADI Inc.)

Los anticuerpos policlonales purificados se dializaron frente a PBS 20 mM, pH 7,4, se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a -20°C.

55 Expresión de NT-proBNP humano recombinante

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

65

Tamizaje de los anticuerpos monoclonales:

Anticuerpos monoclonales, secretados por líneas celulares de hibridoma designadas en la presente descripción como 6G11-F11-D12 y como 1C3-E11-H9 para su uso en un método de inmunoensayo, en donde dichos anticuerpos son
 5 específicos al polipéptido que consiste en los aminoácidos 1-25 de factor natriurético cerebral BNP(1-25) humano N-terminal, se obtuvieron del Dr. Adolfo J. De Bold. Estos monoclonales se produjeron a partir de sobrenadantes para su uso en un ELISA de NT-proBNP en combinación con los anticuerpos policlonales en cabra descritos en la presente, y se designaron 6G11 y 1C3, respectivamente. Estos clones son el tema del documento U.S. SN 10/299,606 presentado en una fecha parecida con este documento y se depositaron, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en la Colección
 10 Americana de Cultivos Tipo, 10801 Universidad Blvd., Manassas, VA 20110-2209 el 5 de diciembre, 2002 con los números de acceso PTA-4844 y PTA-4845, respectivamente. De acuerdo con 37 CFR 1.808, los depositantes aseguran que todas las restricciones impuestas sobre la disponibilidad al público de los materiales depositados se eliminarán irrevocablemente tras el otorgamiento de una patente. Los depositantes además aseguran que los materiales depositados se reemplazarán si no pueden dispensarse las muestras viables por el depositario. 6G11-F11-D12 y 1C3-E11-H9 (con los números de
 15 acceso ATCC PTA-4844 y PTA-4845, respectivamente) se depositaron por Ottawa Heart Institute Research Corporation, 40 Ruskin Street, Ottawa, Ontario (ON), K1Y 4W7, Canadá.

El tamizaje se realizó para:

20 i) MAb(s) de captura potencial con PAb en cabra como detector

Se añadieron sobrenadantes de cultivo de hibridoma confluyente a placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC, MaxiSorp, GIBCO BRL) recubiertas con inmunoglobulinas anti-IgG_(H+L) de ratón (Jackson ImmunoResearch) en burro a 2 µg/ml en tampón de carbonato 100 mM, pH 9,6. Los sitios de unión en exceso se bloquearon con albúmina de suero
 25 bovino (BSA) en PBS, pH 7,4. Después de lavar la placa con tampón de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05% (v/v)), se incubaron en la placa 50 µL de cada sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpo monoclonal. Después de 1 hora de incubación a 37°C en una incubadora de CO₂ la placa se lavó con tampón de lavado. El proBNP humano recombinante (Syn-X Pharma) se añadió entonces a la placa a concentraciones de 3 ng/ml o 0 ng/ml, y la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) en un agitador. Después de lavar la placa, los anticuerpos policlonales en cabra biotinilados purificados por afinidad contra las secuencias peptídicas de aminoácidos de proBNP 1-25, 26-51 o 52-76 (Syn-X Pharma), diluidos apropiadamente en PBS con BSA al 0,5% (p/v), se añadieron a los pocillos apropiados. Los anticuerpos policlonales en cabra se biotinilaron usando un estuche de etiquetado con biotina de Roche siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de 1 hora de incubación a RT en un agitador, la placa se lavó y se añadió estreptavidina conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1/5000 y se incubó durante 1 hora a RT
 30 en un agitador. Después del lavado, se añadió solución de sustrato de TMB (Moss) y después de 8 minutos de incubación a RT en la oscuridad, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 1 N y se leyó la densidad óptica a 450_{nm}. Se seleccionaron los clones para la producción de ascitis basándose en la capacidad de emparejarse con el anticuerpo policlonal en cabra respectivo para producir una señal específica de alta intensidad en los pocillos que contienen el antígeno proBNP, y señal mínima en los pocillos que no contienen antígeno proBNP.

40 ii) MAb(s) detector potencial con PAb en cabra como captura

Placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con anticuerpos policlonales en cabra purificados por afinidad contra secuencias peptídicas de aminoácidos de proBNP 1-25, 26-51 o 52-76 (Syn-X Pharma) a 1 µg/ml en tampón de
 45 carbonato 100 mM, pH 9,6. Los sitios de unión en exceso se bloquearon como en el método (i). Después del lavado con tampón de lavado, el proBNP recombinante humano (Syn-X Pharma) se añadió a los pocillos a concentraciones de 3 ng/ml o 0 ng/ml y la placa se incubó durante 2 horas a TA en un agitador. A continuación del lavado, los sobrenadantes de cultivo del hibridoma confluyente que contienen los anticuerpos monoclonales se añadieron (50 µL por pocillo) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C en una incubadora de CO₂. Después de otra etapa de lavado, el anti-IgG_(H+L) de ratón en burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1/5000 se añadió a la placa y se incubó durante 1 hora a RT en un agitador. Se añadió el sustrato TMB, después del lavado, y las placas desarrollaron color como en el método (i). Se seleccionaron los clones para la producción de ascitis basándose en la capacidad de emparejarse con el anticuerpo policlonal de cabra respectivo para producir una señal específica de alta intensidad en los pocillos que contienen el antígeno proBNP, y una señal mínima en los pocillos sin antígeno.

55 Selección final del anticuerpo monoclonal 6G11:

Después de la producción de los anticuerpos monoclonales seleccionados por ascitis, y la posterior purificación por Proteína G (Pharmacia) con el uso de procedimientos conocidos, los anticuerpos purificados se analizaron de nuevo como
 60 se describió anteriormente para la detección de sobrenadantes de hibridoma, pero por el hecho de que los anticuerpos monoclonales purificados se diluyeron adecuadamente en tampón de carbonato 100mM, pH 9,6 y recubrieron directamente sobre la placa para su tamizaje como capturas, o diluido apropiadamente en PBS que contiene BSA al 0,5% (p/v) para el tamizaje como detectores.

65 La especificidad y sensibilidad óptima del ELISA para proBNP recombinante humano y NT-proBNP recombinante humano se obtuvieron con el uso de la combinación del anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad contra la secuencia

26-51 del péptido aminoacídico proBNP como captura con el clon AcM designado 6G11 como detector. Refiriéndose ahora a la Figura 5, se expone el procedimiento para llevar a cabo el ensayo ELISA de la presente invención.

Los análisis posteriores de los datos derivados a partir de las muestras de plasma humano analizadas de acuerdo con estos procedimientos han demostrado la utilidad de esta combinación de anticuerpos para proporcionar una sensibilidad y especificidad excelentes al medir los niveles de NT-proBNP en individuos aparentemente sanos frente a pacientes con insuficiencia cardíaca.

De acuerdo con esta invención, se proporciona un estuche de prueba ELISA con el fin de llevar a cabo el procedimiento descrito anteriormente.

Reactivos suministrados:

Tiras de microtitulación recubiertas con proteínas anti-NT-proBNP

Un soporte de tira que contiene 96 pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo policlonal de cabra anti-NT-proBNP. Almacenado a 2-8°C, en la bolsa con desecante, hasta el vencimiento.

Estándares de proteínas NT-proBNP

Seis viales, cada uno contiene uno de los siguientes estándares: 0, 50, 150, 375, 1500, y 3000 pg/ml de NT-proBNP, se proporcionan. Cada vial contiene 0,5 ml, excepto el estándar de 0 pg/ml que contiene 1,0 ml. El volumen extra permite diluir las muestras que tienen valores superiores a 3000 pg/ml, si se desea analizarlas nuevamente. Almacenar a -70±10°C. Mantenedos a esta temperatura, los estándares son estables durante al menos 3 ciclos de congelación/descongelación y hasta 6 meses.

Controles de proteínas NT-proBNP

Dos viales, de 0,5 ml cada uno, que contienen controles de NT-proBNP a baja y alta concentración de proteína. Almacenar a -70±10°C.

Mantenedos a esta temperatura, los controles son estables durante al menos 3 ciclos de congelación/descongelación y hasta 6 meses.

Tampón de incubación

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

Anticuerpo detector

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

Conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP)

Un vial que contiene 10 ml de anti-inmunoglobulina de ratón en burro marcadas con peroxidasa de rábano picante. Almacenar a 2-8°C hasta su vencimiento.

Solución de cromógeno

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

Concentrado de lavado

Una botella que contiene 60 ml de solución salina regulada con fosfato más detergente no iónico. Diluir el contenido 25 veces con agua desionizada antes de su uso. Almacenar a 2-8°C.

Solución de detención

Una botella que contiene 10 ml de ácido sulfúrico IN. Almacenar a 2-8°C.

Procedimiento de ensayo:

Al realizar el ensayo, el tiempo entre la adición de las muestras, los estándares y los controles al primer pocillo y al último pocillo no debe exceder los 10 minutos. Para grandes series de muestras, ejecutar el ELISA en lotes pequeños para acomodar este marco de tiempo.

Marcar los pocillos de la microplaca que se usan.

Agregar 50 µl del tampón de incubación a cada pocillo con el uso de una pipeta semiautomática.

- 5 Usar una micropipeta de precisión, añadir 50 µl de cada muestra de prueba, estándar de NT-proBNP o control de NT-proBNP al micropocillo apropiado. Para garantizar la consistencia de la curva estándar, se recomienda el siguiente orden de adición en la placa:
- Muestras de prueba
 Estándares de NT-proBNP
 10 Controles de NT-proBNP

Se recomienda que los estándares y controles de NT-proBNP se prueben por duplicado.

- 15 Cubrir los micropocillos con el uso de una cubierta de placa adhesiva e incubar durante 2 horas en un agitador de microplacas orbital a temperatura ambiente.

Aspirar y lavar cada micropocillo tres veces con la solución de lavado con el uso de una lavadora de microplacas adecuada. Secar completamente invirtiendo la placa sobre el material absorbente.

- 20 Dado que el lavado incompleto afecta negativamente a la precisión del ensayo, se recomienda encarecidamente el uso de una lavadora automática de microplacas. Alternativamente, si no se dispone de una lavadora automática de microplacas, el lavado puede llevarse a cabo manualmente aspirando repetidamente los contenidos de los micropocillos y rellenando tres veces cada micropocillo con 340 µl de solución de lavado.

- 25 Adicionar 100 µl de solución de anticuerpo detector a cada pocillo con el uso de una pipeta semiautomática.

Incube los pocillos durante 1 hora en un agitador de microplacas orbital a temperatura ambiente.

- 30 Aspirar y lavar los micropocillos tres veces con la solución de lavado con el uso de una lavadora de microplacas adecuada. Secar completamente invirtiendo la placa sobre el material absorbente.

Adicionar 100 µl de solución de conjugado de HRP a cada pocillo con el uso de una pipeta semiautomática.

- 35 Cubrir los micropocillos con el uso de una cubierta de placa adhesiva e incubar durante 30 minutos en un agitador de microplacas orbital a temperatura ambiente.

Aspirar y lavar los micropocillos tres veces con la solución de lavado. Secar completamente invirtiendo la placa sobre el material absorbente.

- 40 Adicionar 100 µl de la solución TMB a cada pocillo con el uso de una pipeta semiautomática.

Incubar los pocillos en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Evitar la exposición a la luz solar directa.

- 45 Adicionar 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 1N) a cada pocillo con el uso de una pipeta semiautomática.

Medir la absorbancia de la solución en los micropocillos con el uso de un lector de microplacas a 450 nm.

Cálculo de resultados:

- 50 Calcular la absorbancia promedio para cada pocillo que contiene el estándar, plasma de individuo control o prueba.

Representar la lectura de la absorbancia promedio para cada uno de los estándares a lo largo del eje y (cuadrático) contra la concentración de NT-proBNP, en pg/ml, a lo largo del eje x (lineal).

- 55 Dibujar la curva estándar que mejor se ajusta a través del promedio de los puntos duplicados.

Determinar las concentraciones de NT-proBNP del plasma de los individuos prueba y controles interpolando desde la curva estándar.

- 60 Las muestras de plasma de individuo que tengan lectura menor que el estándar más bajo deben ser reportadas como tales.

Alternativamente, puede usarse un programa de computadora para manejar los datos de tipo ELISA para evaluar las concentraciones de NT-proBNP en el plasma de individuos de prueba y los controles. Los siguientes datos representan un ejemplo de la curva de dosis respuesta con el uso de este ensayo:

65

Dosis estándar (pg/ml)	Promedio DO 450nm
0	0,046
50	0,095
150	0,178
375	0,347
1500	1,161
3000	1,781

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

Características de rendimiento:

Para asegurar los estándares de control de calidad, dos controles designados- bajo y alto - proporcionados en el estuche deben analizarse en cada ensayo. Se recomienda que cada laboratorio use controles adicionales para la validación de cada práctica.

Resumen de los datos clínicos de NT-proBNP para el ensayo Elisa con el policlonal en cabra-monoclonal 6G11

Hay datos disponibles de 209 individuos diagnosticados con insuficiencia cardíaca congestiva (Clase III y Clase IV de la NYHA) y 101 individuos de control sanos normales. La curva característica operativa del receptor (ROC) se muestra en la Figura 2; se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,974, con un error estándar correspondiente (s.e.) de 0,008. La Figura 3 muestra los gráficos de caja de los niveles de NT-proBNP en los individuos de control y los individuos con insuficiencia cardíaca; a un nivel de corte de 165 pg/mL, la sensibilidad diagnóstica con respecto a los individuos con insuficiencia cardíaca fue del 90,4% (con 189 de 209 individuos con niveles de NT-proBNP por encima del valor de corte) y la especificidad diagnóstica con respecto a los individuos de control fue del 94,1% (con 95 de 101 individuos con niveles de NT-proBNP por debajo del valor de corte).

Comparación con otros ensayos de NT-proBNP y BNP:

En el prospecto del producto para la prueba Biosite Triage BNP (*Triage® Prueba de péptido natriurético* tipo B (BNP), prospecto del producto, Biosite Diagnostics, Inc., 2001), un análisis de curva ROC en datos clínicos obtenidos de 804 individuos con insuficiencia cardíaca y 1286 individuos de control revelaron un AUC de 0,955 (error estándar = 0,0053). Al comparar esta AUC con la del ensayo de NT-proBNP anteriormente descrita, siguiendo el procedimiento de Hanley y McNeil (Hanley JA y McNeil BJ (1982). "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve." *Radiology* 143 29-36); uno se encuentra que el ensayo de NT-proBNP anteriormente descrito tiene un AUC significativamente mayor ($p < 0,001$), indicativo de un desempeño diagnóstico superior.

Fischer y *otros*. (Fischer Y, Filzmaier K, Stiegler H, Graf J, Fuhs S, Franke A, Janssens U y Gressner AM (2001). "Evaluation of a New, Rapid Bedside Test for Quantitative Determination of B-Type Natriuretic Peptide." *Clinical Chemistry* 47 591-594.) proporcionó datos del desempeño al comparar la prueba Triage BNP con un ensayo EIA NT-proBNP de Roche Diagnostics con respecto a 93 individuos con enfermedad cardíaca subyacente y sospecha de insuficiencia cardíaca. Al distinguir individuos con disminución de la función ventricular de aquellos con función ventricular conservada, se obtuvo un AUC de 0,91 ($\pm 0,033$ s.e.) para la prueba de Triage BNP, y se obtuvo un AUC de 0,86 ($\pm 0,040$ s.e.) para el ensayo NT-proBNP de Roche. Dada una correlación reportada entre las dos mediciones de neurohormonas de $r = 0,947$, y siguiendo el método de Hanley y McNeil (Hanley JA y McNeil BJ (1983), "A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curves derived from the same cases." *Radiology* 148 839-843) para comparar los AUC derivados del mismo conjunto de casos, se encuentra que la prueba Triage BNP tiene un AUC significativamente más alto que el del ensayo NT-proBNP de Roche ($p = 0,005$).

Hammerer-Lercher y *otros*. (Hammerer-Lercher. A, Neubauer E, Miller S, Pachinger O, Puschendorf B y Mair J (2001). "Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction." *Clinica Chimica Acta* 310 193-197) compararon el ensayo IMRA BNP de Shionogi con el ensayo EIA NT-proBNP de Biomedica con respecto en la misma población de 57 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable. Al distinguir individuos con disminución de la función ventricular de aquellos con función ventricular conservada, se obtuvo un AUC de 0,75 ($\pm 0,06$ s.e.) para el ensayo de BNP, y se obtuvo un AUC de 0,67 ($\pm 0,07$ s.e.) para el ensayo NT-proBNP de Biomedica. Siguiendo el método de Hanley y McNeil (Hanley JA y McNeil BJ (1983). "A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curves derived from the same cases." *Radiology* 148 839-843), se encuentra que el ensayo BNP de Shionogi tiene un AUC significativamente más alta que el del ensayo de NT-proBNP de Biomedica ($p = 0,009$).

Luchner y *otros*. (Luchner A, Hengstenberg C, Löwel H, Trawinski J, Baumann M, Riegger G, Schunkert H y Holmer S (2002). "N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide After Myocardial Infarction." *Hypertension* 39 99-104) realizaron un amplio estudio clínico con 594 individuos con infarto de miocardio y 449 controles sanos, para determinar la capacidad del ensayo EIA NT-proBNP de Roche para predecir la disminución de la función ventricular en estos individuos. Los autores citaron un AUC de 0,77 ($\pm$ 0,057 s.e.) con respecto al NT-proBNP en la separación de individuos con una fracción de eyección del ventrículo izquierdo de menos del 35% de aquellos con una fracción de eyección más alta. Este AUC es significativamente más bajo que el citado anteriormente para el ensayo de NT-proBNP anteriormente descrito ($p = 0,0001$).

Por lo tanto, sobre la base de cuantificar los ensayos disponibles de diversas formas para determinar la presencia de NT-proBNP en base a un análisis del área bajo la curva, puede esperarse que el presente ensayo muestre un desempeño diagnóstico superior.

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

Debe entenderse que, aunque se ilustra una determinada forma de la invención, no se pretende limitarla a la forma o disposición específica descrita y mostrada en la presente descripción. Una persona con experiencia en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención se adapta bien para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionadas, así como aquellos inherentes a estos. Las modalidades, métodos, procedimientos y técnicas descritos en la presente descripción son realmente representativos de las modalidades preferidas, y pretenden ser ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con las modalidades específicas preferidas, se debe entender que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales modalidades específicas.

La siguiente sección de la descripción consiste en los párrafos numerados que simplemente proporcionan declaraciones de la descripción ya descritas en la presente descripción. Los párrafos numerados en esta sección no son reivindicaciones. Las reivindicaciones se establecen más abajo en la sección titulada "reivindicaciones".

1. El proceso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) útil para diagnosticar, estratificar y predecir la tasa de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva que comprende:

obtener anticuerpos policlonales aislados específicos para una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident. 1, aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident. 1, y aminoácidos 52-76 de la sec. con núm. de ident. 1;

seleccionar un anticuerpo policlonal de dicho grupo y unir dicho anticuerpo policlonal a un soporte sólido; poner a reaccionar una muestra clínica sospechosa de contener fragmentos inmunogénicos de NT-proBNP con dicho anticuerpo policlonal aislado;

proporcionar un anticuerpo monoclonal detector seleccionado para reconocer una secuencia de aminoácidos que se separa y distingue de la secuencia de aminoácidos reconocida por el anticuerpo policlonal;

efectuar una inmunorreacción; y
detectar dicha inmunorreacción.

2. El ensayo de 1 en donde:

dicho anticuerpo policlonal se selecciona como que es específico de una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident. 1.

3. El ensayo de 1 en donde:

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

4. El ensayo de 1 en donde:

dicho anticuerpo monoclonal se produce a partir de la línea celular de hibridoma 6G11-F11-D12, que corresponde a la ATCC # PTA-4844 y es específico para un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident. 1.

5. El ensayo de 1 en donde:

dicho anticuerpo monoclonal se produce a partir de la línea celular de hibridoma 1C3-E11-H9, que corresponde a la ATCC # PTA-4845 y es específico de un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident. 1.

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syn X Pharma, Inc.
 <120> Ensayo ELISA policlonal-monoclonal para detectar el proBNP N-Terminal

<130> 2132PCT.137

<150> Patente de Estados Unidos núm. 10/300,733

<151> 2002-11-18

<150> US 10/359,051

<151> 2003-02-04

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

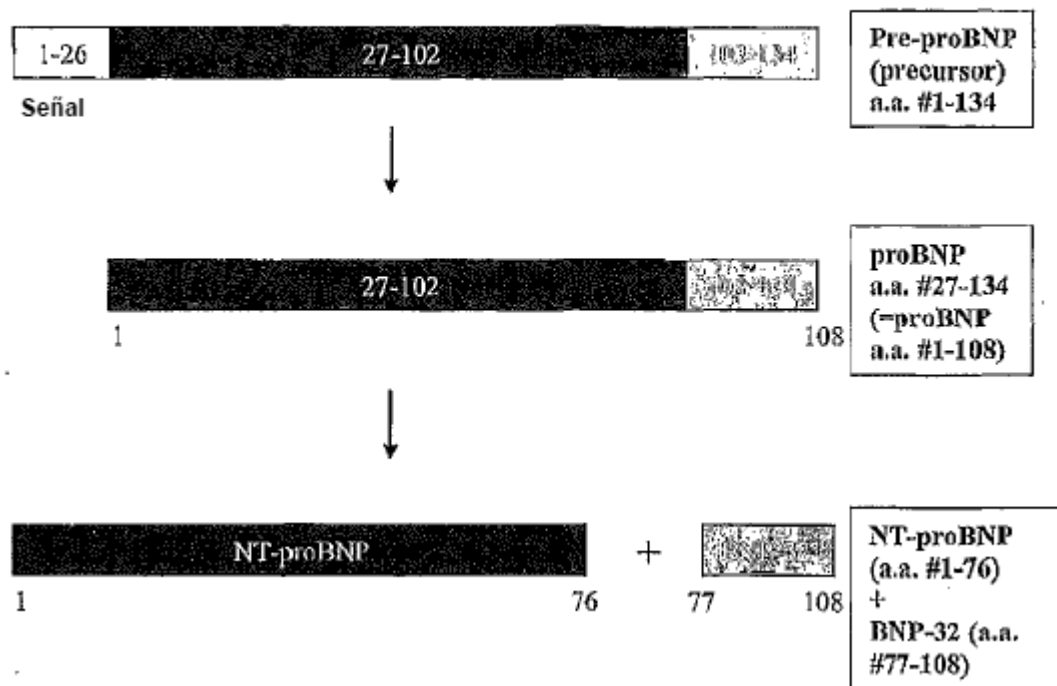
Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 100 105

Reivindicaciones

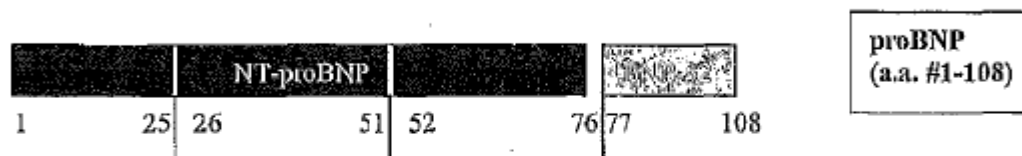
1. Un proceso para determinar la concentración de propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) en una muestra, que comprende:
 - 1) poner en contacto una muestra con los anticuerpos policlonales para formar una primera mezcla, en donde los anticuerpos policlonales se unen a un soporte sólido;
 - 2) poner en contacto la primera mezcla con anticuerpos monoclonales aislados para formar una segunda mezcla, en donde los anticuerpos policlonales son específicos para NT-proBNP dentro de los residuos de aminoácidos 26-51 de la sec. con núm. de ident.: 1, y los anticuerpos monoclonales aislados son específicos para NT-proBNP dentro de los residuos de aminoácidos 1-25 de sec. con núm. de ident.: 1, y
 - 3) cuantificar la cantidad de la segunda mezcla, en donde la segunda mezcla comprende un inmunocomplejo formado por los anticuerpos policlonales y monoclonales con NT-proBNP en la muestra.
2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además comparar la concentración determinada de NT-proBNP en dicha muestra con una concentración de valor de corte seleccionada.
3. Un estuche para determinar la concentración de propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) en una muestra, que comprende:
 - anticuerpos policlonales aislados específicos para NT-proBNP dentro de los residuos de aminoácidos 26-51 de sec. con núm. de ident.: 1, en donde los anticuerpos policlonales se unen a un soporte sólido, y
 - anticuerpos monoclonales aislados específicos para NT-proBNP dentro de los residuos de aminoácidos 1-25 de sec. con núm. de ident.: 1, en donde los anticuerpos policlonales y monoclonales forman un inmunocomplejo detectable con NT-proBNP en la muestra.
4. El estuche de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los anticuerpos policlonales se biotinilan.
5. El estuche de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el inmunocomplejo se detecta directamente, o en donde el inmunocomplejo se detecta indirectamente.
6. El estuche de la reivindicación 3, en donde el soporte sólido es una tira de microtitulación, y en donde los anticuerpos policlonales son anticuerpos policlonales en cabra anti-NT-proBNP.
7. El estuche de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende, además, una solución de cromógeno.
8. El estuche de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la solución de cromógeno es una solución de sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB).
9. El estuche de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además un concentrado de lavado que comprende la solución salina regulada con fosfato y con detergente no iónico.
10. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende, además, una solución de detención que comprende ácido sulfúrico.
11. Un proceso para identificar a un paciente con insuficiencia cardíaca congestiva de las clases III o IV de la Asociación de Cardiología de Nueva York (NYHA) mediante la determinación de la concentración del propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) en una muestra de fluido corporal, que comprende:
 - (a) proporcionar un anticuerpo policlonal que se une específicamente en los residuos de aminoácidos 26-51 de sec. con núm. de ident.: 1, unido a un soporte sólido;
 - (b) hacer reaccionar una muestra clínica sospechosa de contener fragmentos inmunogénicos de NT-proBNP con dicho anticuerpo policlonal;
 - (c) hacer reaccionar un anticuerpo monoclonal detectable que se une específicamente dentro de los residuos de aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 1 con el producto de reacción de la etapa (b);
 - (d) detectar la concentración de anticuerpo monoclonal detectable unido a NT-proBNP en dicha muestra; y
 - (h) determinar si dicha concentración de NT-proBNP en dicha muestra se eleva por encima de una concentración del valor de corte control seleccionado; en donde dicha concentración elevada identifica que el paciente tiene insuficiencia cardíaca congestiva clases III o IV de la NYHA.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 11, en donde los anticuerpos monoclonales se biotinilan.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 11, en donde el inmunocomplejo se detecta directamente, o en donde el inmunocomplejo se detecta indirectamente.
- 5 14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o de las reivindicaciones 11 a 13, en donde dicha muestra es plasma.
- 10 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y las reivindicaciones 11 a 14, en donde los anticuerpos monoclonales específicos para los residuos de aminoácidos 1-25 de sec. con núm. de ident.: 1 se producen por una línea celular de hibridoma designada como 6G11-F11-D12 y depositado en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) como número de acceso PTA-4844, o producido por una línea celular de hibridoma designada como 1C3-E11-H9 y depositada en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) como número de acceso PTA-4845.

FIGURA 1



Péptidos sintetizados con aminoácidos de proBNP (usados para la purificación por afinidad de PAb en cabra):



Péptido 1 = a.a. #1-25 de proBNP

Péptido 2 = a.a. #26-51 de proBNP

Péptido 3 = a.a. #52-76 de proBNP

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

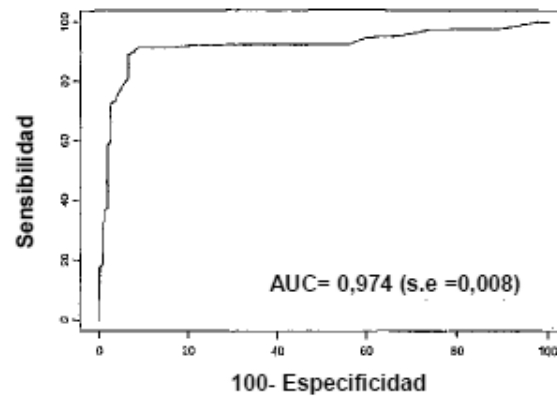


Figura 2: Curva ROC para NT-pro BNP (ensayo de cabra-6G11).

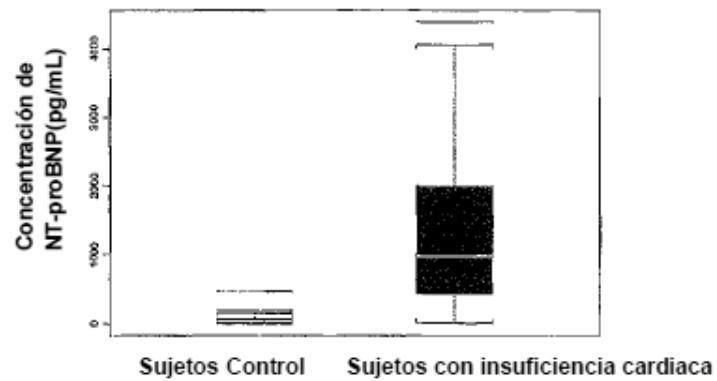


Figura 3: Niveles de NT-proBNP (ensayo cabra-6G11) en sujetos control y sujetos con insuficiencia cardiaca (Clase III y IV de la NYHA).

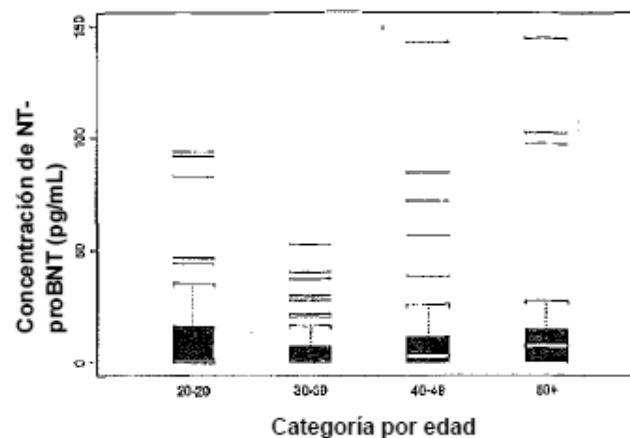


Figura 4: Niveles de NT-proBNP en sujetos control estratificados según categoría por edad.

FIGURA 5

Procedimiento ELISA de NT-proBNP (formato del ensayo cabra/6G11)

