

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 225**

51 Int. Cl.:

G01N 33/577 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2015 PCT/EP2015/058045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15715739 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3132268**

54 Título: **Inmunoensayo para la detección de cromogramina A**

30 Prioridad:

15.04.2014 EP 14164809

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**CÉZANNE S.A.S. (100.0%)
280 Allée Graham Bell, Parc Scientifique Georges Besse
30035 Nimes Cédex 1, FR**

72 Inventor/es:

**CARUHEL, PASCALINE;
RIGAULT, VALÉRIE y
GUÉRIN, NADINE**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 764 225 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 cromogranina A

Antecedentes de la invención

5 La cromogranina A (CgA) es una proteína que se identificó y aisló en 1965 a partir de las células cromafines de la médula suprarrenal bovina (Banks et al. 1965. *Biochem J* 97: 40C-1C; Taupenot et al. 2010. *New Eng J Med.* 348: 1134-49). Las células cromafines son células neuroendocrinas que se encuentran principalmente en la médula de las glándulas suprarrenales en los mamíferos. La cromogranina A es un marcador tumoral establecido en una variedad de tumores neuroendocrinos, un grupo heterogéneo de neoplasias raras de células neuroendocrinas que comprende neoplasia endocrina múltiple, tipo 1 y tipo 2 (MEN1/MEN2), carcinoma medular de tiroides, tumores carcinoides, tumores de células de los islotes, feocromocitoma/paraganglioma, carcinóide pulmonar poco diferenciado /de células pequeñas/ atípico, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células de Merkel (Deftos et al. 1991. *Endocr. Rev.* 12: 181-7; Corti et al. 1996. *Br J Cancer* 73: 924-32) y mencionado en varias directrices (Ramage et al. 2012 *Gut* 61:6-32; Vinik et al. 2010. *NNANETS Pancreas* 39(6): 713-734; Pape et al. 2012. *ENETS* 95: 135-156).

15 La cromogranina A humana tiene una secuencia de 439 residuos de aminoácidos (véase la SEQ ID NO: 1) que constituye una glucoproteína ácida de 49 kDa que se almacena y libera de los gránulos de cromafina de las células endocrinas, neuronas y células neuroendocrinas junto con sus respectivas hormonas, neurotransmisores, y neuropéptidos (Kim et al. 2001. *Cell* 106: 499-509).

20 La cromogranina A es el miembro principal de la familia de la cromogranina/secretogranina que consiste en un grupo de proteínas derivadas de diferentes genes pero que comparten una serie de características, a saber, una abundancia de residuos de aminoácidos ácidos y numerosos pares de aminoácidos básicos como posiciones potenciales para el procesamiento posterior a la traducción (Metz-Boutique et al. 1993. *Eur. J. Biochem* 217: 247-257) y escisión.

25 La CgA es la precursora de varios fragmentos de péptidos biológicamente activos que se han descrito en los seres humanos y en otras especies: vasostatinas (Drees et al. 1991. *Endocrinology* 129: 3381-7), cromostatina (Galindo et al. 1991. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1426-30), crománicos (Strub et al. 1997. *J Biol Chem* 272: 11928-36), pancreastatina (Tatemoto et al. 1986. *Nature* 324: 476-8), WE-14 (Curry et al. 1992. *FEBS Lett* 301: 319-321), catestatina (Mahata et al. 1997. *J Clin Invest* 100: 1623-33), parastatina (Fasciotto et al. 1993 *Endocrinology* 133: 461-6) y GE-25 (Kirchmair et al. 1995. *Biochem J* 310 (Pt 1): 331-6). En la base de datos UniProt, se mencionan péptidos adicionales para la cromogranina A humana (número de acceso: P 10645), en función de los sitios de escisión que pueden predecir los péptidos que se liberarán: la vasostatina-1 comprende la secuencia de aminoácidos 1-76, la vasostatina-2 comprende la secuencia de aminoácidos 1-113, EA-92 comprende la secuencia de aminoácidos 116-207, ES-43 comprende la secuencia de aminoácidos 210-242, la pancreastatina comprende la secuencia de aminoácidos 254-301, SS-18 comprende la secuencia de aminoácidos 304-321, WE-14 comprende la secuencia de aminoácidos 324-337, WA-8 comprende la secuencia de aminoácidos 324-331, LF-19 comprende la secuencia de aminoácidos 340-358, AL-11 comprende la secuencia de aminoácidos 362-372, GV-19 comprende la secuencia de aminoácidos 375-393, GR-44 comprende la secuencia de aminoácidos 395-438 y ER-37 comprende la secuencia de aminoácidos 402-438. Además, se ha mostrado que diferentes células neuroendocrinas pueden procesar la molécula de manera diferente (Portela-Gomes et al. 2001. *J Histochem Cytochem* 4: 483-90).

40 La cromogranina A se ha descrito como un biomarcador para una serie de enfermedades y afecciones que incluyen cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata (WO 2013/070088 A1; WO 2013/070089 A1; US 6,238,877 B1 ; WO 2012/065025 A2).

45 Hoy en día, están disponibles cuatro ensayos comerciales no radiactivos con marcado CE para la detección de cromogranina A: el ensayo ELISA Cis-Bio (Cisbio Bioassays, Codolet, Francia) usa dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos correspondientes a los aminoácidos 145-197 y 219-234, el ensayo ELISA DAKO (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca) usa anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra un fragmento C-terminal de 23 kDa, el ensayo ELISA tipo sándwich NEOLISA™ Euro-Diagnostica (Euro Diagnostica AB, Malmo, Suecia) usa dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos correspondientes a los aminoácidos 236-251 y 264-279 (véanse también WO 2011/135035 A1 y WO 99/58980 A1).

50 El único ensayo totalmente automatizado disponible para la detección de cromogranina A es el ensayo de cromogranina A KRYPTOR (Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf, Alemania) que usa dos anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal que se une a un epítomo correspondiente a los aminoácidos 250-301 (Popovici et al. 2014. *Clin Biochem* 47: 87-91).

55 Debido a la alta proteólisis de la molécula, la concentración medida en estos ensayos puede variar dependiendo del almacenamiento de la muestra recogida a lo largo del tiempo y dependiendo del fragmento que se está midiendo por los anticuerpos en el ensayo, por lo tanto, un ensayo mejorado para la cromogranina A debería abordar los fragmentos más estables de la molécula y se evaluarán en términos de estabilidad de la muestra en diferentes condiciones de almacenamiento.

Diversas publicaciones describen el impacto de los epítomos de anticuerpos y el diseño del ensayo sobre el rendimiento

clínico de los inmunoensayos de cromogranina A (*Corti et al. 1996. Eur J. Biochem 235: 275-280, Stridsberg et al. 2003. J Endocrinol 177: 337-41*).

Resumen de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo diseño de ensayo para la detección de cromogranina A o fragmentos de la misma. Este ensayo usa uno o más anticuerpos que se unen a epítomos, que fueron caracterizados anteriormente como sitios antigénicos de baja o ninguna unión (*Corti et al. 1996. Eur J. Biochem 235: 275-280*). El ensayo de la presente invención muestra sorprendentemente una estabilidad mejorada del analito en la muestra en comparación con el ensayo de cromogranina A KROMPTOR totalmente automatizado existente (B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf, Alemania). El inmunoensayo proporcionado en la presente memoria tiene además un amplio rango de detección, es decir, la detección de la proteína diana es posible al menos en un rango de concentración de aproximadamente 9 ng/ml a aproximadamente 3 mg/ml. El amplio rango de detección da lugar a una ventaja económica, ya que se necesita diluir menos muestras. Por lo tanto, el ensayo de la presente invención puede usarse, p. ej., como una herramienta de investigación y en aplicaciones clínicas para la detección de cromogranina A en un amplio rango de concentraciones y con una alta especificidad. En términos de aplicaciones clínicas, el ensayo de la presente invención puede usarse para la detección de cromogranina A en muestras de pacientes para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos, control de la terapia y/o control postoperatorio de un trastorno o afección médica.

En particular, la presente invención proporciona un método de inmunoensayo para la detección de cromogranina A o un fragmento de la misma que comprende las etapas de: a) poner en contacto una muestra sospechosa de comprender cromogranina A con (i) un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A, en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítopo comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 124 a 144 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y (ii) un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para cromogranina A, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítopo comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 280 a 301 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, en condiciones que permiten la formación de un complejo ternario entre la cromogranina A y los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos, y b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la cromogranina A.

El método de inmunoensayo de la invención puede usarse en el contexto de métodos de diagnóstico. La invención se refiere además a kits para el uso en los métodos de la invención.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una curva estándar que emplea diferentes concentraciones de cromogranina A usando el método de inmunoensayo del Ejemplo 4.

La Figura 2 muestra el perfil de precisión de un inmunoensayo de la presente invención en comparación con el ensayo de cromogranina A KRYPTOR de la técnica anterior (Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf, Alemania) (Ejemplo 5).

Descripción detallada

La presente descripción se refiere a un método de inmunoensayo para la detección de cromogranina A o fragmentos de la misma. El método de inmunoensayo se basa en la detección de cromogranina A usando uno o más anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que son específicos para la cromogranina A. Preferiblemente, el inmunoensayo detecta epítomos en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 124 a 144 y/o 280 a 301 de la secuencia de cromogranina A de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, los fragmentos de cromogranina A que abarcan los residuos de aminoácidos 124 a 144 y/o 280 a 301 de la secuencia de cromogranina A también se pueden detectar con el inmunoensayo proporcionado en la presente memoria. En la presente memoria, los términos "cromogranina A o un fragmento de la misma" o "cromogranina o fragmento(s) de la misma" abarcan, por lo tanto, la cromogranina A y todos los fragmentos de la misma que comprenden el o los epítomos detectados por el inmunoensayo descrito la presente memoria. Preferiblemente, el ensayo emplea al menos un anticuerpo que detecta un epítopo en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 124 a 144 de la secuencia de cromogranina A de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. La cromogranina A o, según sea el caso, el o los fragmentos de la misma pueden detectarse cualitativa y/o cuantitativamente mediante la unión de uno o preferiblemente dos anticuerpos a la cromogranina A o un fragmento de la misma. En el caso de un inmunoensayo tipo sándwich (es decir, que emplea dos anticuerpos), se detectará la presencia de cromogranina A o su fragmento si ambos anticuerpos se unen a la cromogranina A o su fragmento. En otras palabras, la descripción en un aspecto se refiere a un inmunoensayo para la detección de cromogranina A o un fragmento de la misma en una muestra que comprende las etapas de poner en contacto dicha muestra con un primer anticuerpo anti-cromogranina A (o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo) y un segundo anticuerpo anti-cromogranina A (o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo) y detectar la presencia de complejos inmunes ternarios de dichos anticuerpos y la cromogranina A (o fragmento(s) de la misma). Los complejos inmunes se formarán en condiciones que permitan una reacción inmunológica entre dicho

anticuerpo/anticuerpos y dicha muestra (es decir, en condiciones que permitan la unión del anticuerpo/anticuerpos a la cromogranina A o fragmento(s) de la misma, es decir, la formación de un complejo ternario en el caso de un ensayo tipo sándwich). En el inmunoensayo, se puede usar preferiblemente una combinación de dos anticuerpos, p. ej., en formato tipo sándwich (véase más adelante). Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un método de
5 inmunoensayo para la detección de cromogranina A (o un fragmento de la misma) que comprende las etapas de

a) poner en contacto una muestra sospechosa de comprender cromogranina A (o un fragmento de la misma) con un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A o un fragmento de la misma y un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para cromogranina A o un fragmento de la misma, y

b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la cromogranina A o un fragmento de la misma. En el método de inmunoensayo según la descripción, dicho primer anticuerpo es preferiblemente específico para un epítipo en la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en la secuencia que abarca los aminoácidos 124 a 144 de la SEQ ID NO: 1. El primer anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

La presente descripción también se refiere a un método de inmunoensayo para la detección de cromogranina A (o un fragmento de la misma) que comprende las etapas de

a) poner en contacto una muestra sospechosa de comprender cromogranina A (o un fragmento de la misma) con un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A o un fragmento de la misma y un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A o un fragmento de la misma en condiciones que permitan la formación de un complejo ternario entre la cromogranina A o un fragmento de la misma y los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos, y

b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la cromogranina A o un fragmento de la misma. En el método de inmunoensayo según la descripción, dicho primer anticuerpo es preferiblemente específico para un epítipo en la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en la secuencia que abarca los aminoácidos 124 a 144 de la SEQ ID NO: 1. El primer anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

La descripción también se refiere a un método de inmunoensayo para la detección de cromogranina A o fragmentos de la misma que comprende las etapas de

a) poner en contacto una muestra sospechosa de comprender cromogranina A con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A o un fragmento de la misma en condiciones que permitan la formación de un complejo inmune entre la cromogranina A y el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno o derivados del mismo, en donde dicho primer anticuerpo es específico para un epítipo que abarca los aminoácidos 124 a 144 de la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1). El anticuerpo que es específico para el epítipo que abarca los aminoácidos 124 a 144 de la secuencia de cromogranina A es preferiblemente el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 537/H2 depositada en el Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, el 20 de febrero de 2014 como DSM ACC3231.

En lo que sigue, el término "anticuerpo" también comprende fragmentos de unión a antígeno o derivados a no ser que se afirme otra cosa.

El término "anticuerpo" generalmente comprende anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales y fragmentos de unión de los mismos, en particular, fragmentos Fc, así como los denominados "anticuerpos de cadena única" (*Bird R. E. et al (1988) Science 242:423-6*), *anticuerpos quiméricos, humanizados, en particular, anticuerpos injertados con CDR, y fragmentos di y tetravalentes (Holliger P. et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-8)*. También están comprendidas proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, la presentación en fagos para unirse específicamente a la molécula de interés contenida en una muestra. En este contexto, los términos "específico" y "unión específica" se refieren a anticuerpos generados frente a la molécula de interés o un fragmento de la misma. Se considera que un anticuerpo es específico, si su afinidad hacia la molécula de interés (aquí: cromogranina A) o el fragmento mencionado de la misma es al menos 50 veces mayor, preferiblemente 100 veces mayor, lo más preferiblemente al menos 1.000 veces mayor, que hacia otras moléculas comprendidas en una muestra que contiene la molécula de interés. Es bien conocido en la técnica cómo desarrollar y seleccionar anticuerpos con una especificidad dada. Como se indicó anteriormente en la presente memoria, se prefieren los anticuerpos monoclonales.

Como se discutirá en la presente memoria más adelante en más detalle, los anticuerpos (primero y/o segundo) o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos del método de inmunoensayo como se describe en la presente memoria, pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales preparados por ingeniería genética.

En el método de inmunoensayo según la descripción, dicho primer anticuerpo puede ser específico para un epítipo en la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en la secuencia que abarca los aminoácidos 124 a 144 de la SEQ ID NO: 1. El primer anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

5 En el método de inmunoensayo según la descripción, dicho segundo anticuerpo puede ser específico para un epítipo en la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en la secuencia que abarca los aminoácidos 280 a 301 de la SEQ ID NO: 1. El segundo anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

10 En un aspecto particular del inmunoensayo de la descripción, el primer anticuerpo es específico para un epítipo en la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1) que abarca los residuos de aminoácidos 124-144 y el segundo anticuerpo es específico para un epítipo en la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1) que abarca los residuos de aminoácidos 280 a 301. El primer y segundo anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales.

15 El primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo puede producirse, por ejemplo, mediante la línea celular de hibridoma 537/H2 depositada en el DSMZ (Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) el 20 de febrero de 2014 como DSM ACC3231. El anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 537/H2 se une específicamente a los residuos de aminoácidos 124 a 144 de la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1), es decir, a la SEQ ID NO: 2. Se ha generado contra el péptido antigénico de la SEQ ID NO: 4.

20 El segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo puede producirse, por ejemplo, mediante la línea celular de hibridoma 541/E2 depositada en el DSMZ, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, el 20 de febrero de 2014 como DSM ACC3232. El anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 541/E2 se une específicamente a los residuos de aminoácidos 280 a 301 de la secuencia de cromogranina A (SEQ ID NO: 1), es decir, a la SEQ ID NO: 3. Se ha generado contra el péptido antigénico de la SEQ ID NO: 5.

25 En una realización particular del método de inmunoensayo de la invención, el primer anticuerpo es producido por la línea celular de hibridoma 537/H2 depositada en el DSMZ, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, el 20 de febrero de 2014 como DSM ACC3231 y el segundo anticuerpo es producido por la línea celular de hibridoma 541/E2 depositada en el DSMZ, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, el 20 de febrero de 2014 como DSM ACC3232.

30 La unión de los anticuerpos a la cromogranina A (o un fragmento de la misma) tiene lugar en condiciones adecuadas (es decir, que permiten inmunorreacciones, es decir, la unión de los anticuerpos a la cromogranina A y la formación de complejos inmunes). El experto en la materia conoce dichas condiciones y pueden usarse formatos estándar de inmunoensayos, p. ej., como se describe a continuación. Dichas condiciones serán preferiblemente temperatura, pH y fuerza iónica fisiológicos y pueden tener lugar en medios tales como, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato (PBS).

35 Los métodos de detección preferidos comprenden inmunoensayos en varios formatos tales como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), matrices de lechos basados en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas, formatos de ensayo rápido tales como, por ejemplo, ensayos de tira inmunocromatográfica, y monitorización de reacciones seleccionadas/múltiples (SRM/MRM).

40 Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos competitivos y no competitivos. En un aspecto particularmente preferido, el ensayo está en la forma de un ensayo tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en donde la molécula a detectar y/o cuantificar está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, p. ej., un lecho, una superficie de un pocillo u otro contenedor, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, p. ej., con un colorante, con un radioisótopo, o un resto reactivo o catalíticamente activo o viceversa. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se mide entonces mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos involucrados con los "ensayos tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la técnica (*The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayo 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol. 2006 feb; 10(1):4-10. PMID: 16376134*).

50 En un aspecto particularmente preferido, el ensayo comprende dos anticuerpos que ambos están presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en donde un primer componente de marcaje está unido al primer anticuerpo, en donde dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la extinción o la amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje está unido al segundo anticuerpo, de manera que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito, se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos tipo sándwich formados en la disolución que comprende la muestra.

55 Aún más preferido, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o un colorante de quimioluminiscencia, en particular un colorante del tipo cianina.

En el contexto de la presente descripción, los ensayos basados en fluorescencia pueden comprender el uso de

colorantes, que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que comprende FAM (5 o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de 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'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirodamina-6G (R6G5), 6-carboxirodamina-6G (RG6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina, rodamina 110, colorantes de BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde de Oregón, cumarinas tales como umbeliferona, bencimidias, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Flúor Alexa, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina y similares.

En el contexto de la presente descripción, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden el uso de colorantes, basados en los principios físicos descritos para 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, p. 518-562*, incluyendo las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son ésteres de acridinio. Las cromogranina A puede detectarse, por ejemplo, usando sistemas de inmunoensayo tipo sándwich totalmente automatizados en el instrumento B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS (Thermo Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf/Berlín, Alemania). Este analizador de acceso aleatorio emplea la tecnología sensible de Emisión de Criptato Amplificado por Tiempo Resuelto (TRACE), basada en una transferencia no radiactiva entre dos fluoróforos.

En aspectos específicos de la descripción, uno de los anticuerpos (p. ej., el primer anticuerpo) está marcado y el otro anticuerpo (p. ej., el segundo anticuerpo) está unido a una fase sólida o puede unirse selectivamente a una fase sólida. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se prefiere en el contexto de los métodos de la descripción que el primer y el segundo anticuerpo estén presentes dispersos en una mezcla de reacción líquida, y en donde un primer componente de marcaje que es parte de un sistema de marcaje basado en la extinción o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia está unido al primer anticuerpo, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje está unido al segundo anticuerpo de manera que, tras la unión de ambos anticuerpos a la cromogranina A (o fragmento(s) de la misma), se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos tipo sándwich resultantes en la disolución de medición.

Como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo puede estar basado en la unión de un analito a detectar a una o más sondas de captura con una cierta afinidad. Con respecto a la interacción entre los anticuerpos y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferiblemente mayor de 10^8 M^{-1} .

El método de inmunoensayo de la presente descripción puede usarse en el contexto de métodos de diagnóstico y/o pronóstico en los que la presencia y/o ausencia o el nivel de cromogranina A (o fragmento(s) de la misma) se detecta en una muestra de un sujeto que se va a diagnosticar. La cromogranina A se ha implicado en una serie de enfermedades y afecciones que incluyen tumores carcinoides, tumores neuroendocrinos, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, gastritis, enfermedad pulmonar, infarto de miocardio, hipertensión, insuficiencia cardíaca, enfermedades pulmonares, trombósis, obesidad y diabetes. Por lo tanto, el inmunoensayo de la presente descripción puede usarse en el diagnóstico de una enfermedad o afección seleccionada del grupo de cáncer (incluyendo tumores carcinoides, tumores neuroendocrinos, cáncer de próstata y cáncer de vejiga), gastritis, enfermedad pulmonar, infarto de miocardio, hipertensión, insuficiencia cardíaca, enfermedades pulmonares, trombósis, obesidad y diabetes.

La "sensibilidad" de un ensayo se refiere a la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como tales, es decir, la capacidad de identificar resultados positivos (resultados positivos verdaderos/número de positivos). Por lo tanto, cuanto más bajas son las concentraciones del analito que se pueden detectar con un ensayo, más sensible es el ensayo. La "especificidad" de un ensayo se refiere a la proporción de negativos que se identifican correctamente como tales, es decir, la capacidad de identificar resultados negativos (negativos verdaderos/resultados negativos). Para un anticuerpo, la "especificidad" se define como la capacidad de un sitio de unión a antígeno individual para reaccionar con un único epítipo antigénico. El comportamiento de unión de un anticuerpo también se puede caracterizar en términos de su "afinidad" y su "avidéz". La "afinidad" de un anticuerpo es una medida de la fuerza de la reacción entre un único epítipo antigénico y un único sitio de unión al antígeno. La "avidéz" de un anticuerpo es una medida de la fuerza general de unión entre un antígeno con muchos epítopos y anticuerpos multivalentes.

La sensibilidad y especificidad de un ensayo de diagnóstico y/o pronóstico dependen de algo más que la "calidad" analítica del ensayo, también dependen de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas de Característica Operativa del Receptor (curvas ROC) se calculan típicamente representando el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" (es decir, individuos aparentemente sanos que no tienen un trastorno o afección prenatal) y "enfermas". Para cualquier marcador particular, una distribución de los niveles del marcador para sujetos con y sin una enfermedad probablemente se superpondrán. En dichas condiciones, un ensayo no distingue absolutamente lo normal de lo enfermo con una precisión del 100 %, y el área de superposición indica dónde el ensayo no puede distinguir lo normal de lo enfermo. Se selecciona un umbral, por debajo del cual el ensayo se considera anormal y por encima del cual el ensayo se considera normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita la identificación correcta de una afección. Las curvas ROC se pueden usar incluso cuando los resultados del ensayo no proporcionan necesariamente un número exacto.

- Siempre que se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo en muestras de "enfermedad" pueden clasificarse según el grado (p. ej., 1= bajo, 2= normal y 3= alto). Esta clasificación se puede correlacionar con los resultados en la población "normal" y crear una curva ROC. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., *Hanley et al. 1982. Radiology 143: 29-36*. Preferiblemente, se selecciona un umbral para proporcionar un área de curva ROC mayor de aproximadamente 0,5, más preferiblemente mayor de aproximadamente 0,7, aún más preferiblemente mayor de aproximadamente 0,8, incluso más preferiblemente mayor de aproximadamente 0,85, y lo más preferiblemente mayor de aproximadamente 0,9. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- el 5 % de una medición dada.
- El eje horizontal de la curva ROC representa (1-especificidad), que aumenta con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la tasa de verdaderos positivos. Por lo tanto, para un punto de corte particular seleccionado, se puede determinar el valor de (1-especificidad), y se puede obtener una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que el nivel del marcador medido permita la identificación correcta de una enfermedad o afección. Por lo tanto, el área bajo la curva ROC se puede usar para determinar la efectividad del ensayo.
- En otros aspectos, se usa una razón de probabilidad positiva, razón de probabilidad negativa, razón de probabilidad o razón de riesgo como una medida de la capacidad de un ensayo para predecir el riesgo o diagnosticar un trastorno o afección ("grupo enfermo"). En el caso de una razón de probabilidad positiva, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo control. En el caso de una razón de probabilidad negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable entre los sujetos en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de ensayo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo control.
- En el caso de una razón de probabilidad, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo control.
- En el caso de una razón de riesgo, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (p. ej., muerte) es igual en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo control.
- El experto en la técnica comprenderá que asociar un indicador de diagnóstico o pronóstico, con un diagnóstico o con un riesgo de pronóstico de un resultado clínico futuro es un análisis estadístico. Por ejemplo, un nivel de marcador inferior a X puede indicar que un paciente tiene más probabilidades de padecer un resultado adverso que los pacientes con un nivel mayor o igual a X, según lo determinado por un nivel de significación estadística. Además, un cambio en la concentración del marcador desde los niveles de línea base puede reflejar el pronóstico del paciente, y el grado de cambio en el nivel del marcador puede estar relacionado con la gravedad de los eventos adversos. La significación estadística a menudo se determina comparando dos o más poblaciones y determinando un intervalo de confianza y/o un valor p. Véase, p. ej., *Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983*. Los intervalos de confianza preferidos de la descripción son el 90 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % y 99,99 %, mientras que los valores p preferidos son 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, y 0,0001.
- La descripción se refiere además a un kit para la detección de cromogranina A que comprende
- (i) un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo que es específico para la cromogranina A o un fragmento de la misma; y
 - (ii) un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo que es específico para la cromogranina A o un fragmento de la misma.
- El primer y segundo anticuerpos del kit son preferiblemente específicos para el mismo fragmento o fragmentos de cromogranina A.
- Por ejemplo, (i) el primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo comprendido dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 1; y/o (ii) el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo comprendido dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el primer anticuerpo del kit es un anticuerpo monoclonal anti-cromogranina A producido por la línea celular de hibridoma 537/H2 depositada como DSM ACC3231 y/o el segundo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-cromogranina A producido por la línea celular de hibridoma 541/E2 depositada como DSM ACC3232.
- La presente descripción también proporciona una línea celular de hibridoma seleccionada de la línea celular 537/H2 depositada como DSM ACC3231 y la línea celular 541/E2 depositada como DSM ACC3232.
- La descripción, p. ej., se refiere además al uso de un kit en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich para la detección y/o cuantificación de cromogranina A o un fragmento de la misma en una muestra biológica de un fluido

corporal. Dicho fragmento, en un aspecto, comprende al menos una secuencia que abarca los dos epítomos contra los cuales se dirigen los dos anticuerpos, p. ej., el kit puede usarse para la detección y/o cuantificación de la cromogranina A.

5 El término "muestra" es preferiblemente una muestra biológica. "Muestra", tal y como se usa en la presente memoria puede referirse, p. ej., a una muestra de fluido o tejido corporal obtenida para el propósito de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente.

10 Un "paciente", o "sujeto" para los propósitos de la presente descripción incluye tanto seres humanos como otros animales, particularmente mamíferos, y otros organismos. Por lo tanto, los métodos son aplicables tanto a diagnósticos humanos como a aplicaciones veterinarias. En una realización preferida, el paciente es un mamífero, y en la realización más preferida, el paciente o sujeto es un ser humano.

15 Preferiblemente, en la presente memoria, la muestra es una muestra de un fluido o un tejido corporal del sujeto. Se prefiere una muestra de fluido corporal. Las muestras de ensayo preferidas incluyen sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones pleurales. Además, un experto en la técnica se daría cuenta de que algunas muestras de ensayo se analizarían más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

20 Por lo tanto, en una realización preferida de la descripción, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de fluido cefalorraquídeo, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente. Preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre, lo más preferiblemente una muestra de suero o una muestra de plasma. Las muestras de suero son las muestras más preferidas en el contexto de la presente descripción.

25 "Plasma" en el contexto de la presente descripción es el sobrenadante prácticamente libre de células de la sangre que contiene anticoagulante obtenido después de la centrifugación. Los anticoagulantes ejemplares incluyen compuestos de unión a iones de calcio tales como EDTA o citrato e inhibidores de trombina tales como heparinatos o hirudina. El plasma libre de células puede obtenerse por centrifugación de la sangre anticoagulada (p. ej., sangre citrada, con EDTA o heparinizada) durante al menos 15 minutos a 2.000 a 3.000 g.

"Suero" es la fracción líquida de la sangre completa que se recoge después de que se deja coagular la sangre. Cuando la sangre coagulada (sangre coagulada) se centrifuga, se puede obtener suero como sobrenadante. No contiene fibrinógeno, aunque quedan algunos factores de coagulación.

30 Cuando sea apropiado, puede ser necesario homogeneizar la muestra o extraerla con un disolvente antes de su uso en la presente descripción con el fin de obtener una muestra líquida. Una muestra líquida, por la presente, puede ser una disolución o suspensión. Las muestras líquidas pueden someterse a uno o más pretratamientos antes de su uso en la presente descripción. Dichos pretratamientos incluyen, pero no están limitados a, dilución, filtración, centrifugación, concentración, sedimentación, precipitación, diálisis. Los pretratamientos también pueden incluir la adición de sustancias químicas o bioquímicas a la disolución, tales como ácidos, bases, tampones, sales, disolventes, colorantes reactivos, detergentes, emulsionantes, quelantes.

35 El método de la descripción se refiere además a la determinación del nivel de cromogranina A (o fragmento(s) de la misma) en una muestra para diagnóstico o pronóstico o evaluación de riesgos o cribado o control de la terapia o control postoperatorio para afecciones médicas.

40 Por lo tanto, el inmunoensayo o kit de la descripción puede usarse para el diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación de riesgos, control de la terapia y/o para el control postoperatorio de un trastorno o afección médica en un sujeto.

Por lo tanto, en el contexto de la presente descripción, el inmunoensayo o kit puede usarse para el control de la terapia y el control postoperatorio de un trastorno, en el que el trastorno puede ser diferentes tipos de cáncer.

45 Como se mencionó anteriormente en la presente memoria, en el contexto de la presente descripción, el trastorno o afección médica en el sujeto puede seleccionarse preferiblemente de cáncer (incluyendo tumores carcinoides, tumores neuroendocrinos, cáncer de próstata y cáncer de vejiga), gastritis, enfermedad pulmonar, infarto de miocardio, hipertensión, insuficiencia cardíaca, enfermedades pulmonares, trombósis, obesidad y diabetes.

50 En el contexto de la presente descripción, el trastorno o afección médica en el sujeto se selecciona preferiblemente de tumores neuroendocrinos (NET) incluyendo feocromocitomas, NET pancreáticos, NET gastrointestinales, neuroblastomas, carcinomas medulares de tiroides, cáncer de pulmón de células pequeñas, neoplasia endocrina múltiple 1 y síndromes múltiples de neoplasia endocrina 2, cáncer de próstata, enfermedades cardiovasculares, afecciones relacionadas con infecciones y sepsis.

55 El término "biomarcador" (marcador biológico) se refiere a parámetros biológicos mensurables y cuantificables (p. ej., concentración enzimática específica, concentración hormonal específica, distribución de fenotipo génico específico en una población, presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para evaluaciones relacionadas con la

salud y la fisiología, tales como riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición ambiental y sus efectos, diagnóstico de enfermedades, procesos metabólicos, abuso de sustancias, embarazo, desarrollo de líneas celulares, estudios epidemiológicos, etc. Además, un biomarcador se define como una característica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Un biomarcador puede medirse en una muestra biológica (como un análisis de sangre, orina o tejido), puede ser un registro obtenido de una persona (presión arterial, ECG o Holter), o puede ser un ensayo de imagenología (ultrasonidos Doppler uteroplacentario, o translucencia nucal (*Conde-Agudelo et al. 2004. Obstet Gynecol 104: 1367-1391; Bindra et al. 2002. Ultrasound Obstet Gynecol 20: 219-225*)). Los biomarcadores pueden indicar una variedad de características de salud o enfermedad, incluyendo el nivel o tipo de exposición a un factor ambiental, susceptibilidad genética, respuestas genéticas a exposiciones, biomarcadores de enfermedad subclínica o clínica, o indicadores de la respuesta a la terapia. Por lo tanto, una forma simplista de pensar en los biomarcadores es como indicadores del rasgo de la enfermedad (factor de riesgo o biomarcador de riesgo), estado de la enfermedad (preclínica o clínica) o tasa de la enfermedad (progresión). Por consiguiente, los biomarcadores se pueden clasificar como biomarcadores antecedentes (que identifican el riesgo de desarrollar una enfermedad), biomarcadores de cribado (cribado de enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (que reconocen la enfermedad manifiesta), biomarcadores de estadificación (que clasifican la gravedad de la enfermedad) o biomarcadores de pronóstico (predicción del curso futuro de la enfermedad, incluyendo la recurrencia y la respuesta a la terapia, y la monitorización de la eficacia de la terapia). Los biomarcadores también pueden servir como puntos finales sustitutos. Un punto final sustituto es aquel que se puede usar como un resultado en ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la efectividad de las terapias en lugar de la medición del verdadero resultado de interés. El principio subyacente es que las alteraciones en el punto final sustituto siguen de cerca los cambios en el resultado de interés. Los puntos finales sustitutos tienen la ventaja de que pueden reunirse en un marco de tiempo más corto y con menos gastos que los puntos finales tales como la morbilidad y la mortalidad, que requieren grandes ensayos clínicos para su evaluación. Los valores adicionales de los puntos finales sustitutos incluyen el hecho de que están más cerca de la exposición/intervención de interés y pueden ser más fáciles de relacionar causalmente que los eventos clínicos más distantes. Una desventaja importante de los puntos finales sustitutos es que si el resultado clínico de interés está influenciado por numerosos factores (además del punto final sustituto), la confusión residual puede reducir la validez del punto final sustituto. Se ha sugerido que la validez de un punto final sustituto es mayor si puede explicar al menos el 50 % del efecto de una exposición o intervención en el resultado de interés. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una proteína, péptido o una molécula de ácido nucleico.

En la presente memoria, "cromogranina A" se refiere a cromogranina A humana. La secuencia de aminoácidos de la cromogranina A humana se proporciona en la SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos o derivados de la cromogranina A según la descripción también pueden tener modificaciones posteriores a la traducción tales como glicosilación, lipidación o derivatización.

"Diagnóstico" en el contexto de la presente descripción se refiere al reconocimiento y la detección (temprana) de una enfermedad o afección clínica en un sujeto y también puede comprender un diagnóstico diferencial. Además, la evaluación de la gravedad de una enfermedad o afección clínica puede estar abarcado, en ciertos aspectos, por el término "diagnóstico".

"Pronóstico" se refiere a la predicción de un resultado o un riesgo específico para un sujeto que padece una enfermedad o afección clínica particular. Esto puede incluir una estimación de la posibilidad de recuperación o la posibilidad de un resultado adverso para dicho sujeto.

En la presente descripción, los términos "evaluación de riesgos" y "estratificación de riesgos" se refieren a la agrupación de sujetos en diferentes grupos de riesgo según su pronóstico adicional. La estratificación de riesgos también se refiere a la estratificación para aplicar medidas preventivas y/o terapéuticas.

El término "control de la terapia" en el contexto de la presente descripción se refiere a la monitorización y/o ajuste de un tratamiento terapéutico de dicho paciente.

El término "control postoperatorio" en el contexto de la presente descripción se refiere a la monitorización de dicho paciente después de un procedimiento quirúrgico de dicho paciente.

El término "cribado" en el contexto de la presente descripción se refiere a un proceso de inspección de una población, usando un marcador o marcadores específicos y niveles de corte de cribado definidos, para identificar a los individuos de la población con mayor riesgo para un trastorno particular. El cribado es aplicable a una población; el diagnóstico se aplica a nivel del paciente individual.

Secuencias

Secuencia 1 (SEQ ID NO: 1): cromogranina A humana (CGA) sin péptido señal (No. de acceso UniProt P10645); los epítomos antigénicos están subrayados:

```

1           11           21           31           41
LPVNSPMNKG DTEVMKCIVE VISDTLSKPS PMPVSQECFE TLRGDERILS

51          61          71          81          91
ILRHQNLLEKE LQDLALQGAK ERAHQKKHS GFEDELSEVL ENQSSQAELEK

101         111        121        131        141
EAVEEPSSKD VMEKREDSKE AEKSGEATDG ARPQALPEPM QESKAEGNNQ

151         161        171        181        191
APGEEEEEEEE EATNTHPPAS LPSQKYPGPQ AEGDSEGLSQ GLVDREKGLS

201         211        221        231        241
AEPGWQAKRE EEEEEEEAE AGEEAVPEEE GPTVVLNPHP SLGYKEIRKG

251         261        271        281        291
ESRSEALAVD GAGKPGAEAA QDFEGKGEQE HSQQKEEEEE MAVVPQGLFR

301         311        321        331        341
GGKSGELEQE EERLSKEWED SKRWSKMDQL AKELTAEKRL EGQEEEEEDNR

351         361        371        381        391
DSSMKLSFRA RAYGFRGPGP QLRRGWRPSS REDSLEAGLP LQVRGYPEEK

401         411        421        431
KEEEGSANRR PEDQELESLS AIEAELEKVA HQLQALRRG
    
```

5 **Secuencia 2 (SEQ ID NO: 2):** epítomo 1 de cromogranina A humana (CGA) (correspondiente a los residuos 124-144 de SEQ ID NO: 1):

```

1           11           21
SGEATDGARP QALPEPMQES K
    
```

Secuencia 3 (SEQ ID NO: 3): epítomo 2 de cromogranina A humana (CGA) (correspondiente a los residuos 280-301 de SEQ ID NO: 1):

10

```

1           11           21
EHSQQKEEEE EMAVVPQGLF RG
    
```

Secuencia 4 (SEQ ID NO: 4): fragmento de péptido antigénico de cromogranina A humana (CGA) (correspondiente a los residuos 124-144 de SEQ ID NO: 1 más cisteína adicional en el extremo N):

```

1           11           21
CSGEATDGAR PQALPEPMQE SK
    
```

15 **Secuencia 5 (SEQ ID NO: 5):** fragmento de péptido antigénico de cromogranina A humana (CGA) (correspondiente a los residuos 280-301 de SEQ ID NO: 1 más cisteína adicional en el extremo N):

```

1           11           21
CEHSQQKEEEE EEMAVVPQGL FRG
    
```

Ejemplos

Ejemplo 1: generación de anticuerpos

Desarrollo de anticuerpos monoclonales

5 Los inmunógenos se prepararon de la siguiente manera: el péptido CSGEATDGPQALPEPMQESK (SEQ ID NO:4) correspondiente a la región de aminoácidos 124-144 de la molécula de cromogranina A con una cisteína adicional en su extremo N se reticuló covalentemente con el vehículo BSA. El péptido CEHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFRG (SEQ ID NO:5) correspondiente a la región de aminoácidos 280-301 de la molécula de cromogranina A con una cisteína adicional en su extremo N se reticuló covalentemente con el vehículo BSA.

10 Los anticuerpos monoclonales contra los péptidos de cromogranina A 124-144 y 280-301 se generaron mediante procedimientos estándar (*Harlow E, Lane D. Antibodies - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Lane 1985. Journal of Immunology Methods 81:223-228*).

15 Se inmunizaron respectivamente ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad por inyecciones intraperitoneales con 100 µg de péptidos 124-144 o 280-301 diluidos en adyuvante completo de Freund. Las siguientes inyecciones se realizaron usando adyuvante de incompleto de Freund a una dosis de 50 µg y a diferentes intervalos de tiempo durante 61 días.

Antes de la fusión, se detectó la presencia del anticuerpo deseado en el suero de los receptores usando ELISA con el péptido 124-144 o 280-301 inmovilizado. Después, los clones 537/H2 y 541/E2 se cribaron por ELISA con rec inmovilizado. La CGA (cromogranina A recombinante fue preparada por el French National of Scientific Research, "Plate-forme de Production de Protéines Recombinantes" CRBM UMR 5237 CNRS, Montpellier).

20 Para la caracterización del isotipo, se usó el kit de Isotipado de Anticuerpos Monoclonales de Ratón (Roche).

Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de flujo rápido de proteína A (GE Healthcare Life Sciences) según las instrucciones del fabricante.

Marcaje de los anticuerpos

25 En el ensayo final, el anticuerpo 537/H2 se acopló a criptato de europio (CisBio Bioassays, Marcoule, Francia) y el anticuerpo 541/E2 se acopló a Alexa Fluor 647® (Life Technologies, ahora parte de Thermo Fisher Scientific). Las reacciones de acoplamiento se realizaron según los protocolos del fabricante.

Ejemplo 2: desarrollo de un ensayo de cromogranina A usando anticuerpos dirigidos a la región de aminoácidos 124-144 / 280-301

30 Se desarrolló un fluoroinmunoensayo de tipo sándwich homogéneo que usa la tecnología de Emisión de Criptato Amplificada con Resolución Temporal (TRACE) (*Mathis, 1993. Clin Chem 39 (9): 1953-9*) para la detección de un fragmento estable de cromogranina A.

La preparación madre de anticuerpo conjugado criptato-537/H2 y el anticuerpo conjugado Alexa Fluor®-541/E2 se diluyeron a 0,265 µg/ml y 2,94 µg/ml con tampón de ensayo (fosfato 100 mM pH 7, KF 422 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 %, 0,15 mg/ml de Ig de ratón y 0,07 mg/ml de Ig de bovina), respectivamente, antes de su uso.

35 La cromogranina A recombinante se diluyó en suero de caballo para proporcionar estándares de cromogranina A. El inmunoensayo se realizó incubando 14 µl de muestra/estándar, 68 µl de disolución de anticuerpo conjugado Alexa Fluor®-541/E2 y 68 µl de disolución de anticuerpo conjugado criptato-537/H2 a 37 °C en el instrumento B.R.A.H.M.S KRYPTOR (Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf/Berlín, Alemania), según las instrucciones del fabricante. El tiempo de reacción del ensayo fue de 29 min. La fluorescencia específica (RFU) se midió mediante la medición simultánea a doble longitud de onda a 665 y 620 nm usando un instrumento B.R.A.H.M.S KRYPTOR. El rango de lectura directa se definió hasta 3.000 ng/ml y la sensibilidad del ensayo funcional se estimó que era 13,1 ng/ml.

Ejemplo 3: seguimiento de la estabilidad de la cromogranina A en combinados de muestras de suero usando el ensayo CgA II

45 Para el estudio se usaron tres combinados de muestras de suero que se habían congelado a ≤-16 °C justo después de la recogida.

Un combinado se realizó a partir de muestras de suero individuales sanas (Combinado 1) y los otros dos a partir de muestras de suero patológicas (combinados 2 y 3).

50 Los puntos de tiempo de la medición fueron: después de 1, 2 y 3 días a 2-8 °C; después de 1, 2 y 3 días a 18-25 °C; después de 1, 2 y 3 ciclos de congelación/descongelación.

Las mediciones se realizaron en un instrumento KRYPTOR con los reactivos y en las condiciones descritas anteriormente.

El criterio establecido para considerar la estabilidad de la muestra como aceptable es una pérdida $\leq 10\%$ en las diferentes condiciones.

- 5 Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran que el ensayo KRYPTOR (537/H2-Criptato; 541/E2-Alexa Fluor®) no es sensible a hasta 3 ciclos de congelación/descongelación, un día a 2-8 °C o a 18-25 °C. La estabilidad de los 2 combinados patológicos es mejor que la estabilidad observada para el combinado de donantes sanos, ya que solo se observa una disminución limitada de la concentración después de 3 días a 2-8 °C o 18-25 °C ($\leq 11\%$).

10 *Tabla 1: seguimiento de la estabilidad de 3 combinados de muestras de suero usando 537/H2-Criptato; 541/E2-Alexa Fluor® en KRYPTOR*

Condiciones	COMBINADO 1		COMBINADO 2		COMBINADO 3	
	Conc. (ng/ml)	/ Ref.	Conc. (ng/ml)	/Ref.	Conc. (ng/ml)	/ Ref.
Referencia	85,5	-	880	-	2.153	-
3 días 2-8 °C	65,7	-23 %	786	-11 %	1.981	-8 %
2 días 2-8 °C	62,9	-26 %	797	-9 %	2.011	-7 %
1 día 2-8 °C	79,8	-7 %	825	-6 %	2.096	-3 %
3 días 18-25 °C	69,9	-18 %	789	-10 %	1.976	-8 %
2 días 18-25 °C	71,2	-17 %	798	-9 %	2.047	-5 %
1 día 18-25 °C	78,5	-8 %	816	-7 %	2.070	-4 %
3 ciclos de congelación/descongelación	82,8	-3 %	851	-3 %	2.131	-1 %
2 ciclos de congelación/descongelación	90,4	6 %	862	-2 %	2.137	-1 %
1 ciclo de congelación/descongelación	85,4	0 %	875	-1 %	2.153	0 %

Ejemplo 4: curva de calibración

La Figura 1 muestra la curva de respuesta a la dosis para el ensayo KRYPTOR (537/H2-Criptato; 541/E2-Alexa Fluor647®) usando la tecnología de Emisión de Criptato Amplificada con Resolución Temporal (TRACE).

- 15 Sobre la base de la curva de calibración, el rango de lectura directa para el ensayo KRYPTOR (537/H2-Criptato; 541/E2-Alexa Fluor647®) se define hasta 3.000 ng/ml.

Ejemplo 5: perfil de precisión y sensibilidad

- 20 Se midieron en paralelo 91 muestras (24 de donantes sanos y 67 muestras patológicas) usando los anticuerpos 537/H2 y 541/E2 en las condiciones descritas anteriormente y el ensayo de cromogranina A KRYPTOR de la técnica anterior (Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf, Alemania). Las mediciones se realizaron por duplicado y el coeficiente de variación de cada duplicado se representó frente a la concentración de cromogranina A en el mismo gráfico. El perfil de precisión es equivalente para ambos ensayos. La sensibilidad funcional del ensayo reivindicada para el ensayo KRYPTOR de cromogranina A es 9,04 ng/ml; con el ensayo KRYPTOR (537/H2-Criptato; 541/E2-Alexa Fluor647®), la sensibilidad funcional del estimada.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Cézanne S.A.S.
- <120> Inmunoensayo y anticuerpos para la detección de cromogranina A
- <130> X1439 PCT BLN
- <150> EP 14 16 4809.7
- 30 <151> 15.04.2014
- <160> 5
- <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 439
- 35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Cromogranina A humana sin péptido señal

<400> 1

```

Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys
1      5      10      15
Cys Ile Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met
20      25      30
Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile
35      40      45
Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu
50      55      60
Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Lys Lys His Ser
65      70      75      80
Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln
85      90      95
Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met
100     105
Glu Lys Arg Glu Asp Ser Lys Glu Ala Glu Lys Ser Gly Glu Ala Thr
115     120     125
Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu Pro Met Gln Glu Ser Lys
130     135     140
Ala Glu Gly Asn Asn Gln Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu
145     150     155     160
Glu Ala Thr Asn Thr His Pro Pro Ala Ser Leu Pro Ser Gln Lys Tyr
165     170     175
Pro Gly Pro Gln Ala Glu Gly Asp Ser Glu Gly Leu Ser Gln Gly Leu
180     185     190
Val Asp Arg Glu Lys Gly Leu Ser Ala Glu Pro Gly Trp Gln Ala Lys
195     200     205
Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Ala Gly Glu Glu
210     215     220
Ala Val Pro Glu Glu Glu Gly Pro Thr Val Val Leu Asn Pro His Pro
225     230     235     240
Ser Leu Gly Tyr Lys Glu Ile Arg Lys Gly Glu Ser Arg Ser Glu Ala
245     250     255
Leu Ala Val Asp Gly Ala Gly Lys Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gln Asp
260     265     270
Pro Glu Gly Lys Gly Glu Gln Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu
275     280     285
Glu Glu Met Ala Val Val Pro Gln Gly Leu Phe Arg Gly Gly Lys Ser
290     295     300

Gly Glu Leu Glu Gln Glu Glu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Trp Glu Asp
305     310     315     320
Ser Lys Arg Trp Ser Lys Met Asp Gln Leu Ala Lys Glu Leu Thr Ala
325     330     335
Glu Lys Arg Leu Glu Gly Gln Glu Glu Glu Asp Asn Arg Asp Ser
340     345     350
Ser Met Lys Leu Ser Phe Arg Ala Arg Ala Tyr Gly Phe Arg Gly Pro
355     360     365
Gly Pro Gln Leu Arg Arg Gly Trp Arg Pro Ser Ser Arg Glu Asp Ser
370     375     380
Leu Glu Ala Gly Leu Pro Leu Gln Val Arg Gly Tyr Pro Glu Glu Lys
385     390     395     400
Lys Glu Glu Glu Gly Ser Ala Asn Arg Arg Pro Glu Asp Gln Glu Leu
405     410     415
Glu Ser Leu Ser Ala Ile Glu Ala Glu Leu Glu Lys Val Ala His Gln
420     425     430
Leu Gln Ala Leu Arg Arg Gly
435

```

5

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

ES 2 764 225 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<223> residuos 124-144 de cromogranina A humana

<400> 2

```

Ser Gly Glu Ala Thr Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu Pro
1      5      10      15
Met Gln Glu Ser Lys
      20
    
```

5

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> residuos 280-301 de cromogranina A humana

<400> 3

```

Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Met Ala Val Val Pro
1      5      10      15
Gln Gly Leu Phe Arg Gly
      20
    
```

<210> 4

15

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido antigénico de cromogranina A humana

20

<400> 4

```

Cys Ser Gly Glu Ala Thr Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu
1      5      10      15
Pro Met Gln Glu Ser Lys
      20
    
```

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido antigénico de cromogranina A humana

<400> 5

```

Cys Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu Glu Met Ala Val Val
1      5      10      15
Pro Gln Gly Leu Phe Arg Gly
      20
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un método de inmunoensayo para la detección de cromogranina A o un fragmento de la misma que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto una muestra sospechosa de comprender cromogranina A con
 - 5 (i) un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A, en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 124 a 144 de acuerdo con la SEQ ID NO : 1 y
 - 10 (ii) un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo específico para la cromogranina A, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo comprendido en la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 280 a 301 de acuerdo con la SEQ ID NO : 1, en condiciones que permitan la formación de un complejo ternario entre la cromogranina A y los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos, y
 - 15 b) detectar la unión de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos a la cromogranina A.
2. El método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, en donde el primer anticuerpo es producido por la línea celular de hibridoma 537/H2 depositada como DSM ACC3231.
3. El método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el segundo anticuerpo es producido por la línea celular de hibridoma 541/E2 depositada como DSM ACC3232.
4. El método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra se deriva de un fluido o tejido corporal de un sujeto tal como fluido corporal seleccionado de sangre, suero, plasma y orina.
5. El método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ensayo se realiza en fase homogénea o en fase heterogénea.
- 25 6. El método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde uno de los anticuerpos está marcado y el otro anticuerpo está unido a una fase sólida o puede unirse selectivamente a una fase sólida.
7. El método de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el primer y el segundo anticuerpo estén presentes dispersos en una mezcla de reacción líquida, y en donde un primer componente de marcaje que es parte de un sistema de marcaje basado en la extinción o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia está unido al primer anticuerpo, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje está unido al segundo anticuerpo de manera que, tras la unión de ambos anticuerpos a la cromogranina A que se va a detectar, se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos tipo sándwich resultantes en la disolución de medición.
- 30 8. El método de inmunoensayo según la reivindicación 7, caracterizado porque el sistema de marcaje comprende criptatos o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante fluorescente o quimioluminiscente, en particular del tipo cianina.
- 35 9. Un kit para la detección de cromogranina A que comprende
 - 40 (i) un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo que es específico para la cromogranina A en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo comprendido dentro de la secuencia que abarca los aminoácidos 124 a 144 de la SEQ ID NO: 1; y
 - 45 (ii) un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo que es específico para la cromogranina A, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo es específico para un epítipo comprendido dentro de la secuencia que abarca los aminoácidos 280 a 301 de la SEQ ID NO: 1 de la cromogranina A.
10. El kit según la reivindicación 9, en donde
 - (i) el primer anticuerpo se selecciona de la línea celular 537/H2 depositada como DSM ACC3231,
 - (ii) el segundo anticuerpo se selecciona de la línea celular 541/E2 depositada como DSM ACC3232.
- 50 11. El uso del método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para el diagnóstico in vitro, pronóstico, evaluación de riesgos, estratificación

de riesgos, control de la terapia y/o control postoperatorio de un trastorno o afección médica en un sujeto.

12. El uso según la reivindicación 11, en donde el trastorno o afección médica se selecciona del grupo de cáncer, gastritis, enfermedad pulmonar, infarto de miocardio, hipertensión, insuficiencia cardíaca, enfermedades pulmonares, trombósis, obesidad y diabetes.

Fig. 1

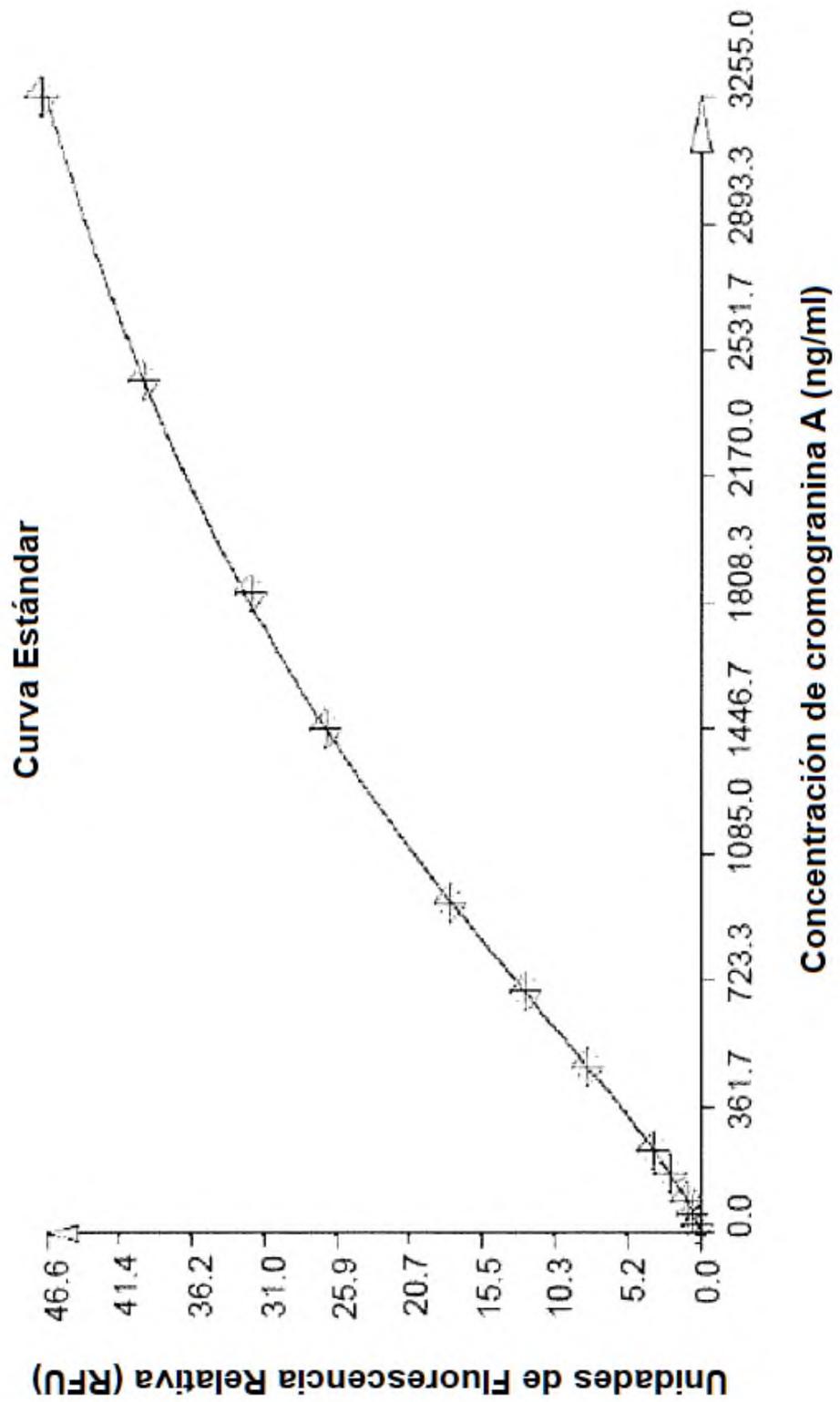


Fig. 2

