



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 131**

51 Int. Cl.:
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05852305 .1**
96 Fecha de presentación : **29.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1817584**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Anticuerpos y antígenos peptídicos para la producción de anticuerpos que tienen una especificidad de unión selectiva para la hormona paratiroidea (PTH) 1-84 intacta bioactiva.**

30 Prioridad: **29.11.2004 US 998927**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2011

73 Titular/es: **Richard J. Zahradnik**
33142 Acapoloco Drive
Dana Point, California 92673, US
Lavigne, Jeffrey R.

72 Inventor/es: **Zahradnik, Richard J. y**
Lavigne, Jeffrey R.

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 367 131 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

Anticuerpos y antígenos peptídicos para la producción de anticuerpos que tienen una especificidad de unión selectiva para la hormona paratiroidea (PTH) 1-84 intacta bioactiva.

5

Antecedentes de la invención

La hormona paratiroidea (PTH) y su importancia en la regulación de la concentración de iones de calcio en la sangre es bien conocida. En este sentido, esta hormona se crea por las glándulas paratiroideas y, en combinación con otros factores, actúa en la regulación de los niveles de iones de calcio en la sangre, de manera tal que la misma se mantiene en una concentración constante, tanto en las células como en los fluidos que las rodean. Esencialmente, la PTH actúa en la liberación del calcio almacenado en el cuerpo cuando los niveles del calcio sérico disminuyen. Por otra parte, esta secreción se suprime en la medida en que la concentración del calcio sérico se incrementa.

10

En su forma completa, la PTH comprende un péptido único compuesto de 84 aminoácidos. La secuencia específica de la PTH, al igual que se proporciona para una pluralidad de especies, a saber humanos, ratas, ratones, bóvidos, perros, cerdos, gatos y monos, se representa en la Figura 1, y una variante de la misma en la Figura 2, la cual ilustra la estructura relativamente consistente que mantiene esta hormona entre dichas especies identificadas.

15

Debido a su importancia en el metabolismo del calcio, no solamente para los humanos sino para una variedad de especies, la medición precisa de la PTH ha sido y continúa siendo de importancia clínica sustancial. Como está bien documentado, los niveles séricos de la PTH sirven como un parámetro importante para los pacientes que tienen enfermedades tales como la hipercalcemia, el hiperparatiroidismo primario y la osteoporosis, entre muchas otras. La PTH también se vuelve de importancia clínica sustancial en pacientes que sufren de insuficiencia renal crónica quienes, debido a las anomalías de la PTH, pueden desarrollar osteodistrofia renal.

20

25

A pesar de su importante papel en el metabolismo y su significación clínica, continúan existiendo dificultades sustanciales en cuanto a la determinación de los niveles de PTH biológicamente activa circulante. En primer lugar, es bien conocido que la PTH está normalmente presente en niveles extremadamente bajos, los cuales están normalmente entre 10 pg/ml y 65 pg/ml. Además, se conoce que el péptido de la PTH puede estar presente en una variedad de fragmentos de PTH circulantes, y en particular, en fragmentos grandes circulantes de PTH no-(1-84), los cuales parecen co-emigrar cromatográficamente con la molécula de PTH (7-84), y se sabe que interfieren significativamente con los ensayos de mediciones convencionales de PTH. De hecho, los fragmentos grandes de PTH no-(1-84) pueden representar aproximadamente la mitad (1/2) de la PTH que se mide por la mayoría de los ensayos actuales. Ejemplos de las actuales deficiencias de la medición exacta de PTH se establecen en la solicitud internacional del Tratado de Cooperación en materia de Patentes No. PCT/US00/00855, publicación internacional No. WO/00/42437, titulada Methods for Differentiating and Monitoring Parathyroid and Bone Related Diseases, y en Lepage, Raymond y col., A Non-(1-84) Circulating Parathyroid Hormone (PTH) Fragment Interferes With Intact PTH Commercial Assay Measurement in Uremic Samples, Clinical Chemistry 44 4, 1998, páginas 805-809.

30

35

40

En un intento de abordar estas deficiencias, se introdujo, por Scantibodies Laboratory, de Santee, California, un nuevo ensayo para detectar los niveles de PTH el cual incorpora un anticuerpo trazador que tiene una especificidad de unión con el final de la fracción N-terminal de la PTH humana, y, más específicamente, con los primeros seis residuos de aminoácidos de la misma. Como se entiende actualmente, este ensayo parece minimizar la reactividad cruzada con los fragmentos grandes de PTH no-(1-84). Sin embargo, para derivar estos anticuerpos se requiere esfuerzo y gasto considerables en la purificación de los mismos. Además, estos anticuerpos trazadores tienen el máximo reconocimiento solamente para el primer residuo de aminoácido de la PTH, y una especificidad sustancialmente reducida para cualquiera los residuos subsiguientes, haciendo imposible por consiguiente su uso para otras especies donde el primer aminoácido es diferente. Estas desventajas se discuten en el artículo de John, M. R. y col., titulado A Novel Immunoradiometric Assay Detects Full-Length Human PTH but not Amino-Terminally Truncated Fragments: Implications for PTH Measurements in Renal Failure, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Vol. 84, No. 11, 1999, p. 4287-4290.

45

50

Los documentos US2002/0110871 A1, DE 4434551 A1 y WO03/003986 A2, se refieren en general a anticuerpos contra la hormona paratiroidea y a los métodos relacionados.

55

Por lo tanto, ha sido y continúa siendo una necesidad largamente sentida en el estado de la técnica, un ensayo de parejas de unión y el método de generación de las mismas, que sea específico para la PTH intacta bioactiva, que pueda determinar los niveles de PTH con reactividad cruzada mitigada para los fragmentos peptídicos de la PTH. Igualmente, existe una necesidad en el estado de la técnica de mejorar las parejas de unión a la PTH que puedan medir los niveles de PTH en una manera más coste-efectiva, que tengan una mayor afinidad por la PTH y que puedan ser fácilmente incorporadas en juegos de reactivos de inmunoensayo y similares. Más aún, existe una necesidad de parejas de unión, es decir, de anticuerpos que tengan un reconocimiento de unión que sea específico para PTH y que puedan utilizarse para detectar los niveles de PTH en una amplia variedad de especies. Finalmente, existe una necesidad en el estado de la técnica de una pareja de unión mejorada que tenga una alta afinidad de unión por la PTH que pueda ser fácilmente obtenida usando los mecanismos convencionales que requieran

60

65

purificación mínima, que resulte en un mayor reconocimiento de unión para la PTH intacta, que posea una reactividad cruzada mínima para los fragmentos grandes de PTH no-(1-84), y que se pueda derivar utilizando métodos que generan rendimientos de anticuerpos mayores que las parejas unión del estado de la técnica anterior.

5 Breve resumen de la invención

La presente invención específicamente se destina y alivia las deficiencias anteriormente identificadas en el estado de la técnica. En este sentido, la presente invención se dirige a un método para producir anticuerpos que son útiles en determinar los niveles de PTH intacta bioactiva en una muestra de fluido, tal como suero, plasma o medios de cultivo celular de acuerdo con el objeto de la reivindicación 1. Los métodos de la presente invención tienen las ventajas particulares de poseer mayor afinidad por la PTH, y en particular, están diseñados para tener un reconocimiento novedoso para los primeros pocos residuos de aminoácidos, que se extienden desde el primer residuo del N-terminal de la PTH, pero preferentemente que no vaya más allá del cuarto residuo de aminoácido de la PTH. Los anticuerpos tendrán una especificidad para los tres primeros residuos de aminoácidos del N-terminal de la PTH. Los anticuerpos además no tienen reactividad cruzada con las formas moleculares grandes de PTH no-(1-84). Por otra parte, los métodos de producción de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención tienen reactividad cruzada sustancial con una gran variedad de especies, y pueden utilizarse para detectar los niveles de PTH no solamente en humanos, sino también en ratas, ratones, bóvidos, perros, cerdos, gatos y monos.

20 El antígeno comprende la fórmula

VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

25 en la cual X se selecciona del grupo que consiste de LEU [ID SEC.1] y PHE [ID SEC NO. 2]. En ese contexto, este péptido antigénico representa los residuos de aminoácidos 2-12 de la PTH, con el sexto residuo de aminoácido de la misma que es selectivo entre LEU y PHE, el primero que existe en la PTH de los humanos, ratas, ratones y cerdos, por una parte, y el segundo que es inherente a la PTH de los bovinos y perros, por otra parte. En una realización más altamente preferida, el antígeno comprende un péptido que tiene la fórmula

30 Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

35 en la cual X es un residuo de aminoácido seleccionado entre LEU y PHE, según lo mencionado previamente, e Y es un residuo de aminoácido que consiste en, ya sea SER o ALA [ID SEC NO. 3, ID SEC NO. 4, ID SEC NO. 5 e ID SEC NO. 6, respectivamente], el primero que refleja el aminoácido presente en humanos, perros y cerdos, y el segundo que es inherente a la PTH de ratas, ratones y bovinos.

El antígeno comprende la fórmula

VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

40 en la que X se selecciona del grupo que consiste de LEU [ID SEC. 7] o PHE [ID SEC NO. 8]. Este péptido antigénico representa los residuos de aminoácidos 2-15 de la PTH, con el sexto residuo de aminoácido que comprende ya sea LEU o PHE, para reflejar de esta forma el residuo de aminoácido correspondiente que existe en las especies apropiadas anteriormente especificadas. El péptido antigénico representa los residuos de aminoácidos 1-15 de la PTH y comprende la fórmula

Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

50 en la que X comprende el residuo de aminoácido LEU o PHE e Y es un residuo de aminoácido que consiste ya sea en SER o ALA [ID SEC NO. 9, ID SEC NO. 10, ID SEC NO. 11 e ID SEC NO. 12, respectivamente], siendo este último selectivo por corresponder a una especie en particular identificada anteriormente.

55 Con respecto a los métodos de producción de los anticuerpos de acuerdo a la presente invención, estos se dirigen a los anticuerpos que tienen una afinidad y especificidad para los antígenos previamente mencionados. Los anticuerpos son específicos para solamente los primeros tres o cuatro residuos de aminoácidos de la PTH. Estos anticuerpos se producen preferentemente a través de los pasos de administrar un antígeno peptídico de la variedad previamente mencionada, ya sea solo o en combinación con una proteína portadora, a un animal huésped, el cual, preferentemente comprende una cabra, para inducir la producción de anticuerpos contra el antígeno peptídico. En una realización alternativa preferida, la producción de anticuerpos se induce a través de la administración de los fragmentos peptídicos de PTH más grandes. Preferentemente, este fragmento de PTH puede comprender PTH (1-34), el cual puede incluir adicionalmente de forma opcional una proteína portadora covalentemente unida o fusionada al mismo para incrementar la antigenicidad, o PTH (1-84) intacta. En la medida en que los anticuerpos que se busquen tengan que derivarse para la detección de la PTH en humanos, la molécula de PTH (1-84) intacta comprende preferentemente la PTH de rata intacta, o en menor medida, la PTH humana. El título de anticuerpos producidos por la administración del antígeno al animal huésped entonces se monitorea. A partir de este momento, los antisueros producidos en el animal huésped entonces se aíslan y los anticuerpos de los mismos se seleccionan

mediante cromatografía de afinidad, de manera que tengan la especificidad para la región antigénica deseada de la PTH. Los anticuerpos aislados se purifican adicionalmente para eliminar aquellos anticuerpos que tienen afinidad por los residuos de aminoácidos que se extienden más allá del cuarto o quinto residuo de ácido amino del N-terminal de la PTH, mediante el uso de antígenos que se unen correspondientemente ya sea a PTH (4-34) y/o PTH (4-84) o PTH (5-34) y/o PTH (5-84) que retienen los anticuerpos no deseados pero que permiten pasar aquellos anticuerpos específicos solamente para PTH (1-3) o (1-4). Los anticuerpos entonces se pueden marcar o incorporar de otra manera en cualquiera de una variedad de ensayos convencionales para su uso en la detección de PTH, ya bien que este sea para humanos o para cualquiera de una variedad de especies.

Como será reconocido por los expertos en la materia, los métodos de la presente invención se focalizan en aquella porción de la molécula de PTH que posee actividad biológica en el N-terminal, maximizándose de esta manera la detección de la misma. Por otra parte, con respecto a las realizaciones mayormente preferidas, al proporcionarse los métodos de producción de anticuerpos que incluyen otros residuos de aminoácidos que se extienden más allá del sitio N-terminal biológicamente activo (es decir, hasta e incluyendo el duodécimo (12mo) y el quinceavo (15vo) residuos de aminoácidos de la PTH), la especificidad y la afinidad de estos anticuerpos se refinan mucho mejor y permiten a los mismos detectar los niveles de PTH con mayor especificidad y afinidad que los receptores del estado de la técnica, que se han incorporado en los ensayos y similares. Los anticuerpos tienen una especificidad para no más de los tres primeros residuos de aminoácidos de la PTH, lo cual como se ha mencionado, se logra a través de un paso de eliminación o "lavado", mediante el cual los anticuerpos producidos a través del uso de los antígenos de la presente invención se eliminan selectivamente en la medida en que cualquiera de estos anticuerpos tenga una afinidad por PTH (4-34) o PTH (4-84). Como consecuencia, los anticuerpos producidos de acuerdo a los métodos de la presente invención han eliminado sustancialmente la reactividad cruzada para los fragmentos peptídicos grandes de PTH no-(1-84), no poseen el máximo reconocimiento para solamente el primer residuo de aminoácido de la PTH y, además, se derivan fácilmente de una manera coste-efectiva en tanto que los rendimientos de los anticuerpos generados por los métodos de la presente invención deben ser mayores que los de los métodos del estado de la técnica.

Alternativamente, este paso de eliminación o "lavado" se utiliza para eliminar selectivamente los anticuerpos que tienen afinidad por PTH (5-34) o PTH (5-84). De este modo, los anticuerpos aislados en última instancia tendrán una afinidad por no más de los primeros cuatro residuos de aminoácidos del N-terminal de la PTH. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar: métodos de producción de anticuerpos que tienen una afinidad de unión y especificidad para la PTH que poseen reactividad cruzada mitigada para los fragmentos peptídicos grandes de PTH no-(1-84).

Otro objeto de la presente invención es proporcionar: métodos de producción de anticuerpos que tienen una mayor afinidad y especificidad para la PTH que los parejas de unión del estado de la técnica y además, poseen un mayor grado de reactividad cruzada entre las PTH inter-especies, de manera que los antígenos, anticuerpos y métodos de producción de los mismos según la presente invención, se pueden utilizar fácilmente para la detección de PTH en una variedad de especies.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar: métodos de producción de anticuerpos los cuales tienen una afinidad de unión y especificidad para más de la porción N-terminal biológicamente activa de la PTH y, por tanto, son más efectivos y precisos en la determinación de los niveles de PTH intacta bioactiva que las parejas de unión del estado de la técnica dirigidas a la misma.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar: métodos de producción de anticuerpos los cuales no poseen una afinidad de unión máxima para solamente el primer residuo de aminoácido del N-terminal de la PTH.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar: métodos de producción de anticuerpos que son menos costosos para producir y generar mayores rendimientos de anticuerpos que los métodos del estado de la técnica para la producción de anticuerpos que tienen una afinidad de unión y especificidad para el N-terminal de la PTH.

Objetos adicionales de la presente invención son proporcionar: métodos de producción de anticuerpos los cuales derivan fácilmente anticuerpos que pueden incorporarse fácilmente en cualquiera de una variedad de ensayos disponibles comercialmente, y que además, se pueden modificar (por ejemplo, para incluir un marcador, y similares), tal como se puede desear para cualquiera de una variedad de aplicaciones de inmunoensayos.

Breve descripción de los dibujos

Estas, así como otras características de la presente invención, se harán más evidentes en referencia a los dibujos en los cuales:

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de la PTH para una gran variedad de especies, a saber, humanos, ratas, ratones, bovinos, perros, cerdos, felinos y monos, y además representa las secuencias de aminoácidos identificadas en el presente documento como ID SEC NO. 1, ID SEC NO. 2, ID SEC NO. 3, ID SEC NO. 4, ID SEC NO. 5, ID SEC NO. 6, ID SEC NO. 7, ID SEC NO. 8, ID SEC NO. 9, ID SEC NO. 10, ID SEC NO. 11

e ID SEC NO. 12.

La Figura 2 es una ilustración alternativa de la Figura 1 que representa una variación de la secuencia de aminoácidos 1-84 de la PTH de las especies antes mencionadas, y que representa sin embargo la conservación del N-terminal de la PTH en el que las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NOS. 1 a 12 se mantienen relativamente constantes.

La Figura 3 es una vista diagramática de la porción N-terminal de la PTH humana.

La Figura 4 es un diagrama de flujo que representa los pasos para la producción de los anticuerpos de acuerdo con una realización preferida de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención incluye los métodos de producción de los anticuerpos que se dirigen a una región antigénica de la PTH posicionada en la región N-terminal de la misma. Los anticuerpos son específicos para los primeros tres (3) o cuatro (4) residuos de aminoácidos de la PTH. Como se conoce bien, la región N-terminal de la PTH se considera necesaria para la unión del receptor PTH/PTHrp, y es además reconocida como el epítipo más deseable para medir los niveles de PTH intacta bioactiva que se pueden encontrar en una muestra de fluido biológico, tales como el suero, el plasma o los medios de cultivo celular. Los indicativos del estado de la técnica actual asociado con la PTH y los métodos de detección de la misma, se analizan en detalle en la solicitud internacional del Tratado de Cooperación en materia de Patentes No. PCT/US00/00855, publicación internacional No. WO/00/42437, titulada Methods for Differentiating and Monitoring Parathyroid and Bone Related Diseases, y en Lepage, Raymond y col., A Non-(1-84) Circulating Parathyroid Hormone (PTH) Fragment Interferes With Intact PTH Commercial Assay Measurement in Uremic Samples, Clinical Chemistry 44 4, 1998 páginas 805-809. De acuerdo con una realización preferida, el péptido antigénico comprende aquellos residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácidos 2-12 de la PTH, identificados colectivamente como 12 en las Figuras 1-3. Específicamente, este péptido antigénico tiene la fórmula

VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

en la que X es un residuo de aminoácido seleccionado ya sea de LEU [ID SEC NO. 1] o PHE [ID SEC NO. 2]. Como será reconocido por los expertos en la materia, el sexto (6to) residuo de aminoácido de este fragmento peptídico de PTH difiere entre las especies citadas, por lo cual dicho residuo comprende LEU en humanos, ratas, ratones y cerdos por una parte, y por otra comprende PHE en bóvidos y perros. Como se puede apreciar por los expertos en la materia, a pesar de la diferencia de un único residuo de aminoácido, este péptido antigénico se mantiene por lo demás constante entre las especies citadas, lo cual, como se explica más completamente debajo, puede permitir preparar los anticuerpos y en última instancia utilizarlos, ya que al presentar reactividad cruzada, son efectivos en la detección de los niveles de PTH en una variedad de especies. El antígeno peptídico refleja los primeros doce (12) residuos de aminoácidos de la PTH, identificados como 14, y comprende la fórmula

Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

en la que X es un residuo de aminoácido seleccionado ya sea de LEU o PHE e Y es un residuo de aminoácido seleccionado de SER o ALA [ID SEC NO. 3, ID SEC NO. 4, ID SEC NO. 5 e ID SEC NO. 6, respectivamente]. Con respecto a la variación en el primer residuo de aminoácido, se apreciará fácilmente que este péptido antigénico se puede formar de tal manera que dicho aminoácido comprenda SER, como se encuentra en los humanos, perros y cerdos, o ALA, como se encuentra en ratas, ratones y bóvidos. En este sentido, la variación proporcionada para el péptido antigénico, permite libertad de acción de manera que los anticuerpos en última instancia, derivados de estos péptidos antigénicos, se pueden formar de manera que posean la mayor afinidad de unión que pueda desearse para detectar la PTH en una especie determinada.

Los péptidos antigénicos comprenden las secuencias que corresponden a los residuos de aminoácidos 2-15 y 1-15, respectivamente, de la PTH. Con respecto al primero, identificado en las Figuras 1-3 como 16, este péptido antigénico tendrá la fórmula

VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

en la que X es un residuo de aminoácido seleccionado ya sea de LEU [ID SEC. NO. 7] o PHE [ID SEC NO. 8]. Con respecto a la última fórmula correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-15 de la PTH, identificado como 10, este péptido antigénico tendrá la fórmula

Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

en la que X es un residuo de aminoácido seleccionado ya sea de LEU o PHE e Y es un residuo de aminoácido seleccionado de SER o ALA [ID SEC NO. 9, ID SEC NO. 10, ID SEC NO. 11 e ID SEC NO. 12, respectivamente].

Sin perjuicio de las fórmulas anteriores para los péptidos previamente mencionados, se reconocerá que los mismos se extenderán a todos los derivados funcionales de éstos, lo que significa que incluyen los péptidos funcionalmente comparables derivados de la misma región de la PTH, como se refleja en las secuencias de las Figuras 1-3, y que tienen una capacidad similar para inducir anticuerpos anti-PTH, y más particularmente, anticuerpos específicos para los residuos de aminoácidos del N-terminal de la PTH. En este sentido, este derivado funcional puede ser los péptidos posicionados similarmente o los péptidos derivados a partir de las secuencias anteriormente mencionadas, y que se reflejan en las Figuras 1-3, que tienen sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, siempre y cuando la derivación no altere la capacidad del antígeno peptídico para inducir anticuerpos reactivos para la PTH.

Además, debe reconocerse que los antígenos peptídicos incluyen aquellos péptidos cuya secuencia de aminoácidos puede cambiarse dentro de unos pocos aminoácidos aguas arriba o aguas abajo de los péptidos anteriormente mencionados en las Figuras 1-3, así como aquellos péptidos que tienen cambios de aminoácidos conservativos, de tal manera que las sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos o cambios, no afectan significativamente la capacidad del antígeno peptídico para inducir anticuerpos con alta afinidad y especificidad para los primeros doce residuos de aminoácidos de la PTH, o cualquier de los sub-componentes de los mismos.

Con respecto a la producción de anticuerpos, en la Figura 4 se ilustra el método 20 de generación de los mismos. Inicialmente, se proporciona un péptido 22 de la variedad anteriormente mencionada, el cual corresponde a la totalidad o una porción de los primeros doce (12) a quince (15) residuos de aminoácidos de la PTH de una determinada especie. Los péptidos antigénicos utilizados para generar la producción de anticuerpos incluirán los fragmentos más grandes de PTH, incluyendo pero no limitado a PTH (1-34) y al péptido de la PTH (1-84) intacta entera. En este sentido, mientras que los anticuerpos producidos en última instancia tendrán especificidad para aquellos residuos de aminoácidos correspondientes a los péptidos antigénicos previamente mencionados dentro del método de la presente invención, al menos con respecto al paso inicial de proporcionar un antígeno 22 y posteriormente administrar el mismo a través del paso 24 mencionado debajo, se apreciará que el péptido de la PTH entera y cualquier fragmento N-terminal de la misma pueden servir preferentemente como un péptido antigénico apropiado para inducir la producción de anticuerpos, los cuales en última instancia poseen la afinidad de unión y especificidad ideales para la porción biológicamente activa de la PTH en el N-terminal de la misma. El péptido antigénico que se proporciona y administra comprenderá el fragmento de la PTH correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-34 de la PTH, el cual puede opcionalmente acoplarse a una proteína portadora. Este fragmento peptídico, puede de forma alternativa, preferentemente, administrarse como la PTH (1-84) de longitud completa, la cual puede tomar la forma de cualquiera de las especies identificadas en las Figuras 1 y 2. Preferentemente, en el contexto del desarrollo de anticuerpos específicos para la PTH humana, se prefiere el uso de la PTH de rata (1-34) o de la PTH de rata (1-84) de longitud completa.

Estos péptidos antigénicos se pueden producir por cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos en el estado de la técnica, incluyendo la síntesis por métodos convencionales, tales como la síntesis química en fase sólida o mediante la tecnología recombinante. Como se apreciará adicionalmente, los péptidos sintéticos se pueden acoplar opcionalmente por vía química a una proteína portadora, o alternativamente, se pueden generar péptidos recombinantes como proteínas de fusión para incrementar la antigenicidad. Como se apreciará adicionalmente por los expertos en la materia, estos péptidos antigénicos se pueden seleccionar sobre la base de su capacidad de inducir anticuerpos contra la PTH. En este sentido, las técnicas de selección pueden incluir, pero no se limitan a, inmunoprecipitación o inmunoensayo.

Una vez derivados, estos antígenos peptídicos pueden entonces utilizarse para generar los anticuerpos usando las técnicas convencionales. En este sentido, el(los) antígeno(s) peptídico(s), preferentemente en combinación con un adyuvante, se administra(n) a un animal huésped 24, el cual comprende preferentemente una cabra. Debe reconocerse, sin embargo, que otras especies, tales como conejos, ratones, ovejas, pollos, etc., se pueden utilizar adicionalmente como animales huéspedes. En este sentido, la administración de estos antígenos se puede realizar mediante cualquiera de una variedad de métodos, incluyendo pero no limitado a la inyección subcutánea o intramuscular. Como se apreciará, la dosis del antígeno peptídico que se administra, variará correspondientemente con el péptido específico utilizado, así como con el animal huésped. Como se reconocerá adicionalmente, sin embargo, con el objetivo de obtener anticuerpos que poseen la mayor afinidad y especificidad posible para una especie dada, se deben generar anticuerpos separados contra el péptido comparable apropiado proveniente de cada especie.

Una vez administrados, los resultados de los títulos de anticuerpos producidos en el animal huésped se monitorean 26, lo cual se puede realizar por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, usando desangrados de rutina y similares, con los antisueros aislados (por ejemplo, mediante centrifugación), en el paso 28 y, posteriormente, mediante la selección para la presencia de anticuerpos anti-péptido que tengan una afinidad de unión por éste. Se reconocerá además que debido a los métodos inmunológicos convencionales anteriores para derivar los anticuerpos, estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales en la naturaleza. De acuerdo con la práctica convencional, se prefiere que los antisueros se deriven de una pluralidad de animales huéspedes.

Los antisueros resultantes derivados del animal huésped se pueden purificar por afinidad para derivar los

anticuerpos de la presente invención. Como es bien conocido en el estado de la técnica, los antisueros se pueden purificar a través de técnicas convencionales, tales como la introducción en una columna de separación con los péptidos antigénicos previamente mencionados correspondientes a las secuencias de los residuos de aminoácidos 2-12, 1-12, 2-15 y/o 1-15 de la PTH, los cuales se unen a una fase sólida (por ejemplo, perlas y similares). El
5 antisuero se puede lavar entonces para eliminar los anticuerpos que no tienen la especificidad por el péptido o los péptidos antigénicos, quedando unido el anticuerpo específico para el péptido o los péptidos antigénicos, y se eluyen en última instancia a partir de la misma. Este anticuerpo se puede almacenar por las prácticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

10 En el paso 29, los anticuerpos derivados a través de dicho proceso de aislamiento y purificación, se someterán a un proceso de purificación adicional mediante el cual cualquiera de los anticuerpos presentes en los antisueros que tienen una afinidad por PTH (4-34) o (5-34) y/o PTH (4-84) o (5-84), se eliminan o se "lavan" selectivamente. A tal fin, se contempla que una vez que los antisueros se aíslan en el paso 28, los mismos se pueden purificar para
15 eliminar cualquiera de los anticuerpos que tienen especificidad para PTH (4-34) o (5-34) y/o PTH (4-84) o (5-84) para cualquiera de las especies especificadas en el presente documento, a través del uso de una columna de separación u otras técnicas convencionales conocidas mediante las cuales los péptidos antigénicos correspondientes a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de PTH (4-34) o (5-34) o PTH (4-84) o (5-84) se unen a una fase sólida con los antisueros que se pretenden purificar, sometiéndose a la misma. Cualquier anticuerpo que tenga una especificidad para un péptido de PTH (4-34) o (5-34) y/o PTH (4-84) o (5-84), se
20 mantendrá unido, y los anticuerpos restantes que no tienen especificidad por el péptido de PTH (4-34) o (5-34) y/o PTH (4-84) o (5-84), se separarán de éste. Ventajosamente, este proceso aislará de esta manera, solamente aquellos anticuerpos que tienen una afinidad por la mayoría de los primeros tres (3) o cuatro (4) residuos de aminoácidos de la PTH, y por lo tanto no tendrán ninguna afinidad de unión por cualquiera de los residuos de aminoácidos en o más allá del quinto residuo de aminoácido del N-terminal de la PTH. Este proceso asegura así que
25 cualquiera de los anticuerpos aislados en última instancia, de hecho, será específico para la mayor parte del N-terminal de la PTH (1-84), y por lo tanto no se une de otra manera a cualquier tipo de fragmento de la PTH que no incluya al menos los primeros tres o cuatro residuos de aminoácidos del N-terminal de la PTH.

Debido a que estos anticuerpos se aíslan usando aquellos péptidos antigénicos correspondientes a las secuencias
30 de los residuos de aminoácidos 2-12 y 2-15 de la PTH, respectivamente, por lo tanto se aislarán correspondientemente los anticuerpos que no necesariamente hayan adquirido una afinidad de unión, mucho menos una afinidad de unión máxima, para el primer residuo de aminoácido de la PTH, lo que se conoce que es un problema de los anticuerpos derivados a través de los métodos del estado de la técnica anterior. En este sentido, la eliminación o supresión sustancial de los anticuerpos que tienen una afinidad por el primer residuo de aminoácido de
35 la PTH también se logrará mediante la utilización de las secuencias de péptidos correspondientes a 1-12 y 1-15 de la PTH, respectivamente, siempre y cuando estas secuencias se seleccionen a partir de aquellas especies que tienen un primer residuo de aminoácido diferente proveniente de la especie para la cual los anticuerpos que se derivan en última instancia se hayan utilizado. Por ejemplo, con el fin de derivar anticuerpos apropiados para detectar los niveles de PTH en humanos que carezcan de especificidad para el primer residuo de aminoácido de la
40 PTH humana, se reconocerá que los sueros de PTH anti-rata derivados a partir del animal huésped se pueden purificar contra los péptidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos de los residuos 1-12 y 1-15 de la PTH humana. Como se comprenderá, debido a que el primer residuo de aminoácido del N-terminal de la PTH de rata comprende ALA en lugar de la SER que se encuentra en los humanos, cualquiera de los anticuerpos aislados en última instancia necesariamente poseerá una afinidad de unión por los residuos de aminoácidos que se extienden
45 más allá de este primer residuo de aminoácido de la secuencia.

Una vez derivatizados en el paso 30, estos anticuerpos se pueden utilizar en técnicas inmunológicas para correlacionar la presencia de la PTH intacta bioactiva que se puede encontrar en una muestra dada (por ejemplo, en suero o en plasma). En este sentido, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar solos o en
50 combinación para analizar una muestra dada para determinar la presencia de la PTH intacta bioactiva, pero aún ventajosamente evitar la reactividad cruzada con los fragmentos grandes de PTH no-(1-84). A modo de ejemplo, estos anticuerpos pueden incorporarse en un juego de reactivos para ensayo inmunológico. Ejemplos de tales aplicaciones incluyen los juegos de reactivos tipo ELISA para la PTH intacta bioactiva de humanos y la PTH intacta bioactiva de rata, producidos por Immotopics, Inc., de San Clemente, California, los cuales proporcionan un ensayo
55 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa de los niveles de PTH intacta bioactiva en suero, plasma o medios de cultivo celular. En este sentido, dada la aplicabilidad precedente para derivar anticuerpos específicos para la PTH para una gran variedad de especies, se reconocerá que tales juegos de reactivos para ensayos inmunológicos, tales como los proporcionados por Immotopics, Inc., se pueden diseñar específicamente de forma tal que la afinidad y la especificidad de estos anticuerpos se apliquen a una amplia
60 variedad de especies o, alternativamente, que se generen contra el péptido comparable apropiado de una especie dada de tal manera que los juegos de reactivos se hagan más estrechamente a la medida para una especie determinada.

Lista de secuencias

- <110> Zahradnik, Richard J.
Lavigne, Jeffrey R.
- 5 <120> Anticuerpos y Antígenos Peptídicos para la Producción de Anticuerpos que tienen una Especificidad de Unión Selectiva para la Hormona Paratiroidea (PTH) 1-84 Intacta Bioactiva
- <130> IMUNE-001B
- 10 <150> US 09/730,174
<151> 2000-12-05
- <160> 12
- 15 <170> Patent In versión 3.3
- <210> 1
<211> 11
20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos
- 25 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Ser | Glu | Ile | Gln | Leu | Met | His | Asn | Leu | Gly |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
- 30 <210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
<223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos
- <400> 2
- 40
- | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Ser | Glu | Ile | Gln | Phe | Met | His | Asn | Leu | Gly |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
- 45 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos
- <400> 3
- 55
- | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ser | Val | Ser | Glu | Ile | Gln | Leu | Met | His | Asn | Leu | Gly |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |
- 60 <210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 65 <220>

ES 2 367 131 T3

<223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

<400> 4

5 Ser Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly
 1 5 10

10 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

<400> 5

20 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly
 1 5 10

25 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

<400> 6

35 Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly
 1 5 10

40 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

<400> 7

50 Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
 1 5 10

55 <210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

<400> 8

65 Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
 1 5 10

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

 10 <400> 9

 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
 1 5 10 15

 15
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

 <400> 10
 25
 Ser Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
 1 5 10 15

 30
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos

 <400> 11
 40
 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
 1 5 10 15

 <210> 12
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Induce la Formación de Anticuerpos y Aislados de Dichos Anticuerpos
 50
 <400> 12

 Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
 1 5 10 15
 55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la hormona paratiroidea biológicamente activa, denominada PTH (1-84) en la porción N-terminal de PTH (1-84), en la cual dicha porción N-terminal consiste de (i) los tres residuos de aminoácidos del N-terminal de PTH (1-84), o (ii) los cuatro residuos de aminoácidos del N-terminal de PTH (1-84); el método que comprende los pasos de:
- 10 a) administrar un primer antígeno peptídico a un animal huésped para inducir la producción de anticuerpos contra dicho primer antígeno peptídico en dicho animal huésped, dicho primer antígeno peptídico que se selecciona del grupo que consiste de las ID SEC NO. 3, ID SEC NO. 4, ID SEC NO. 5, ID SEC NO. 6, PTH (1-34) y PTH (1-84), donde dicho animal huésped no es un humano;
- b) monitorear el anticuerpo producido por dicha administración de dicho primer antígeno a dicho animal huésped;
- c) extraer los antisueros producidos en dicho animal huésped por dicha administración de dicho primer antígeno peptídico;
- 15 d) aislar y seleccionar al menos un anticuerpo a partir de dichos antisueros extraídos en el paso c) por cromatografía de afinidad utilizando un segundo antígeno peptídico que se selecciona del grupo que consiste de las ID SEC NO. 3, ID SEC NO. 4, ID SEC NO. 5 e ID SEC NO.6;
- e) eliminar dicho al menos un anticuerpo aislado en el paso d) que tiene especificidad para un antígeno peptídico seleccionado del grupo que consiste de PTH (4-34), PTH (5-34), PTH (4-84) y PTH (5-84) mediante cromatografía
- 20 de afinidad utilizando un tercer antígeno peptídico seleccionado del grupo que consiste de PTH (4-34), PTH (5-34), PTH (4-84) y PTH(5-84); y
- f) eliminar dicho anticuerpo en los pasos d) y e) que tiene afinidad de unión por al menos los primeros tres o cuatro residuos de aminoácidos de la porción N-terminal de la PTH y en el cual el anticuerpo aislado no tiene afinidad de unión por cualquiera de los residuos de aminoácidos en o más allá del quinto residuo de aminoácido del N-terminal
- 25 de la PTH mediante la recolección del eluato producido a partir del paso e).
2. El método de la reivindicación 1, en el que en el paso a), dicho animal huésped se selecciona del grupo que consiste de un ratón y un conejo.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en el que en el paso a), dicho animal huésped comprende al menos una cabra.
4. El método de la reivindicación 1, en el que en el paso a), dicha PTH (1-34) proviene de una especie seleccionada del grupo que consiste de un humano, una rata, un ratón, un bovino, un perro, un cerdo, un gato, y un mono.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en el que en el paso a), dicho primer antígeno peptídico tiene una proteína portadora acoplada al mismo.
6. El método de la reivindicación 1, en el que en el paso a), dicha PTH (1-84) proviene de una especie seleccionada del grupo que consiste de un humano, una rata, un ratón, un bovino, un perro, un cerdo, un gato, y un mono.

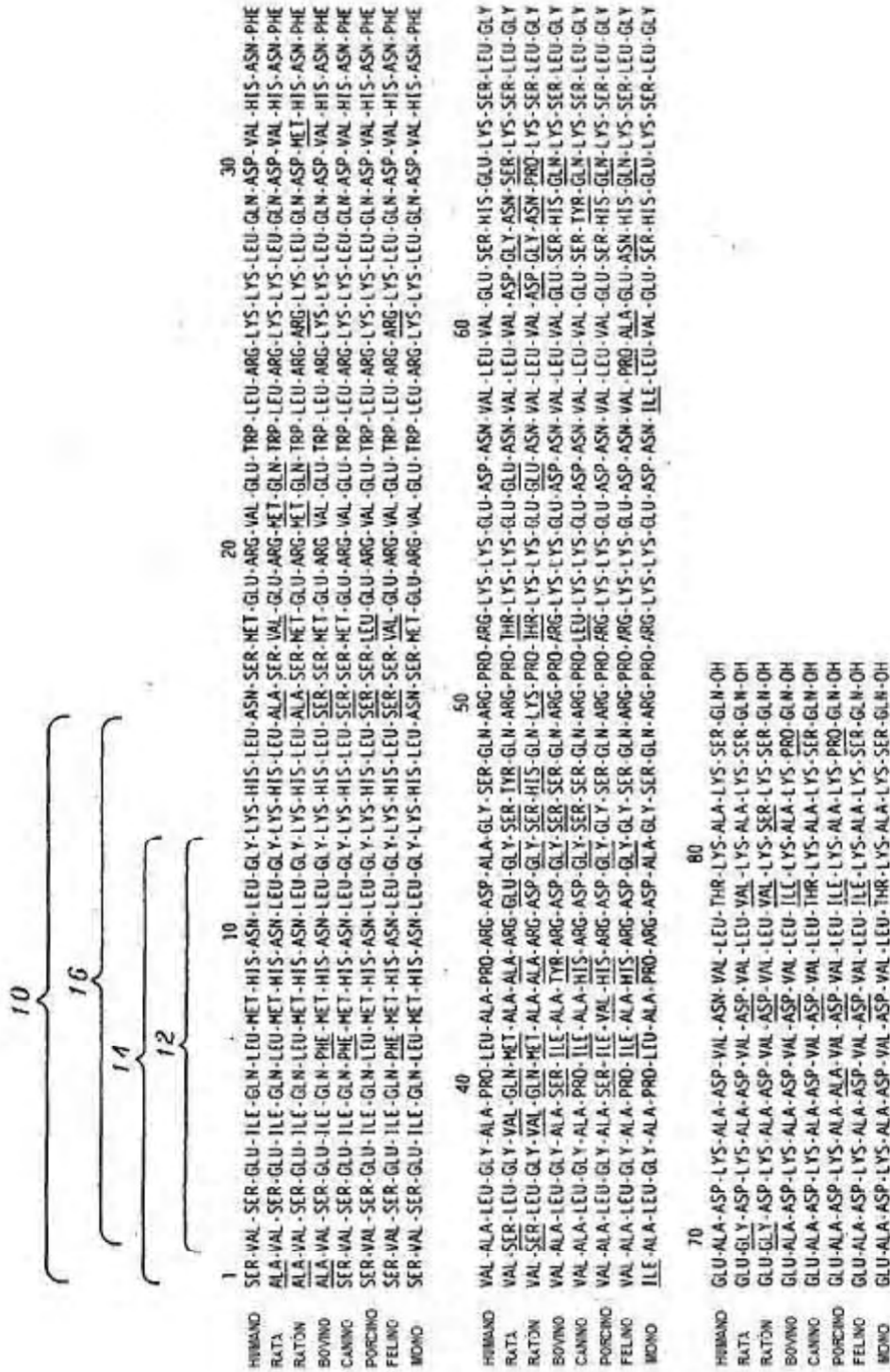


FIG. 1

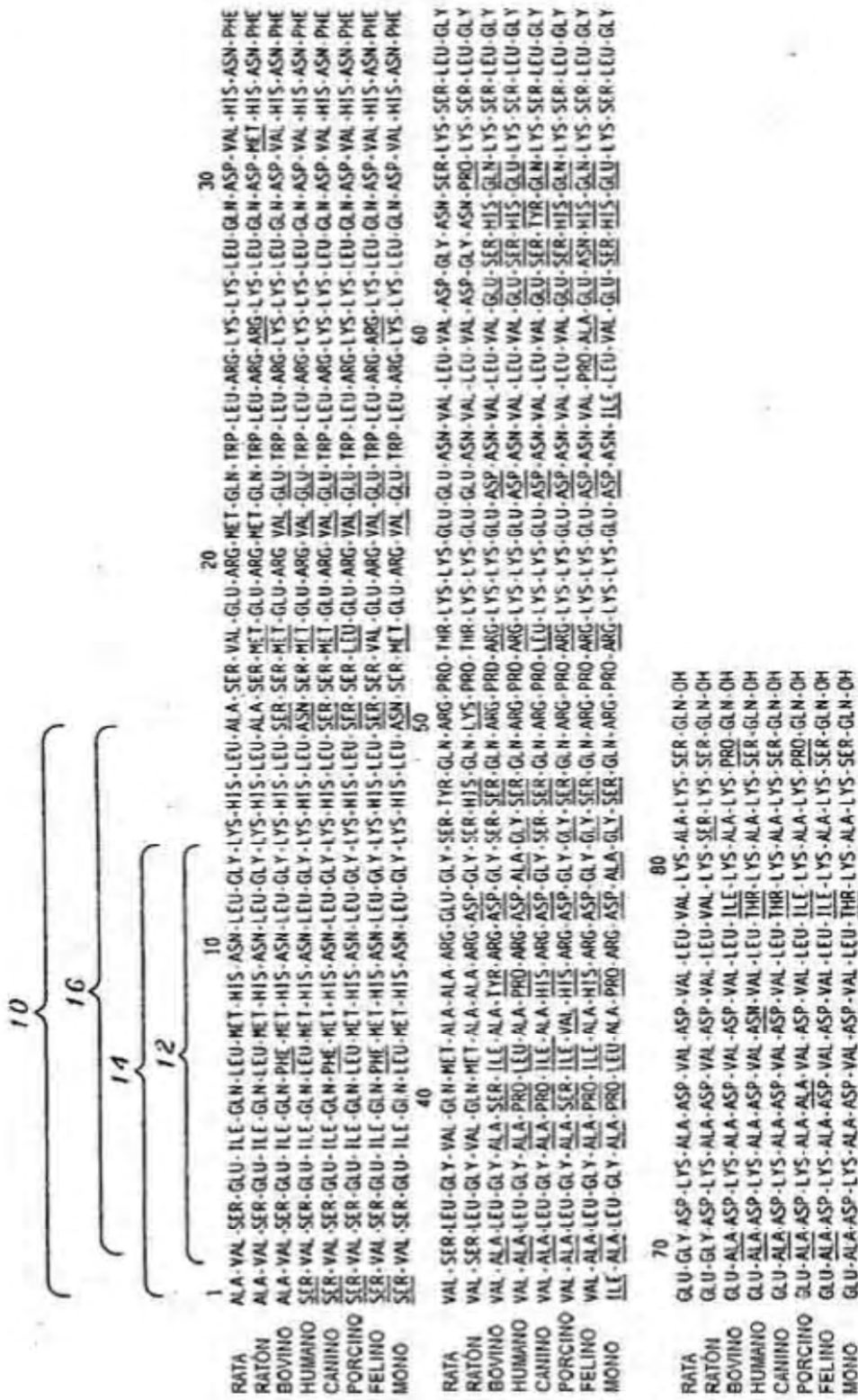


FIG. 2

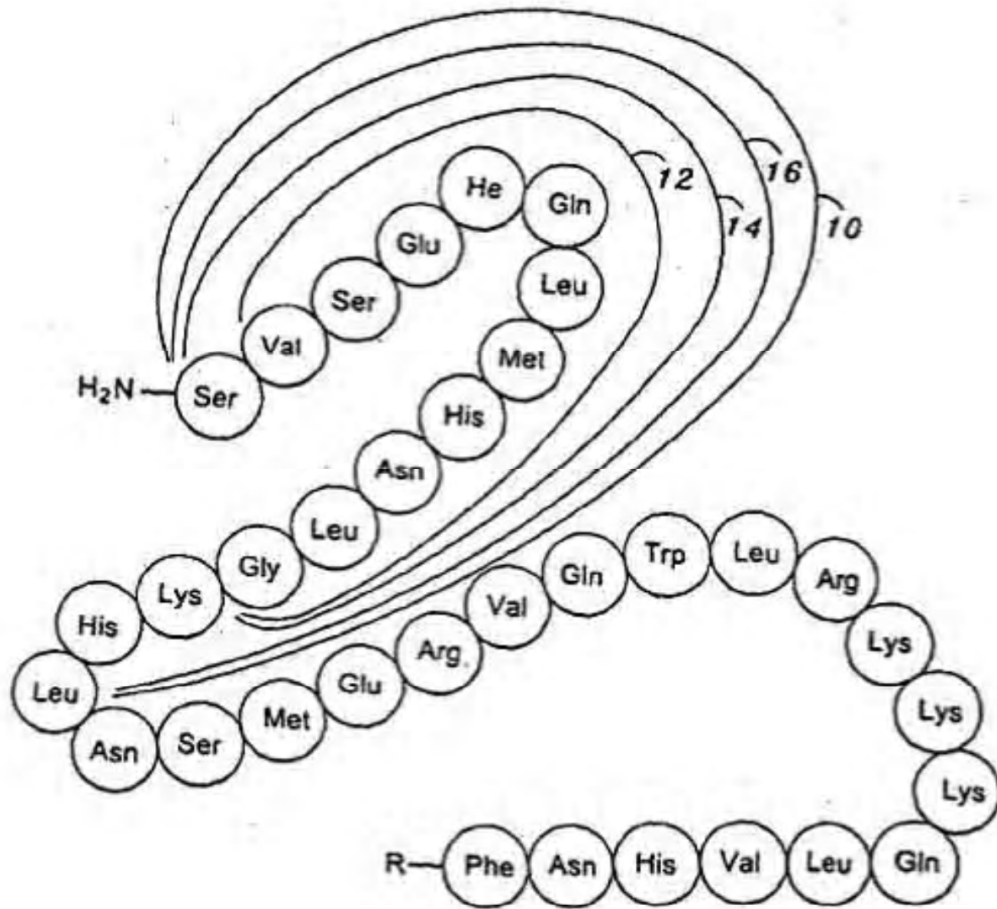


FIG. 3

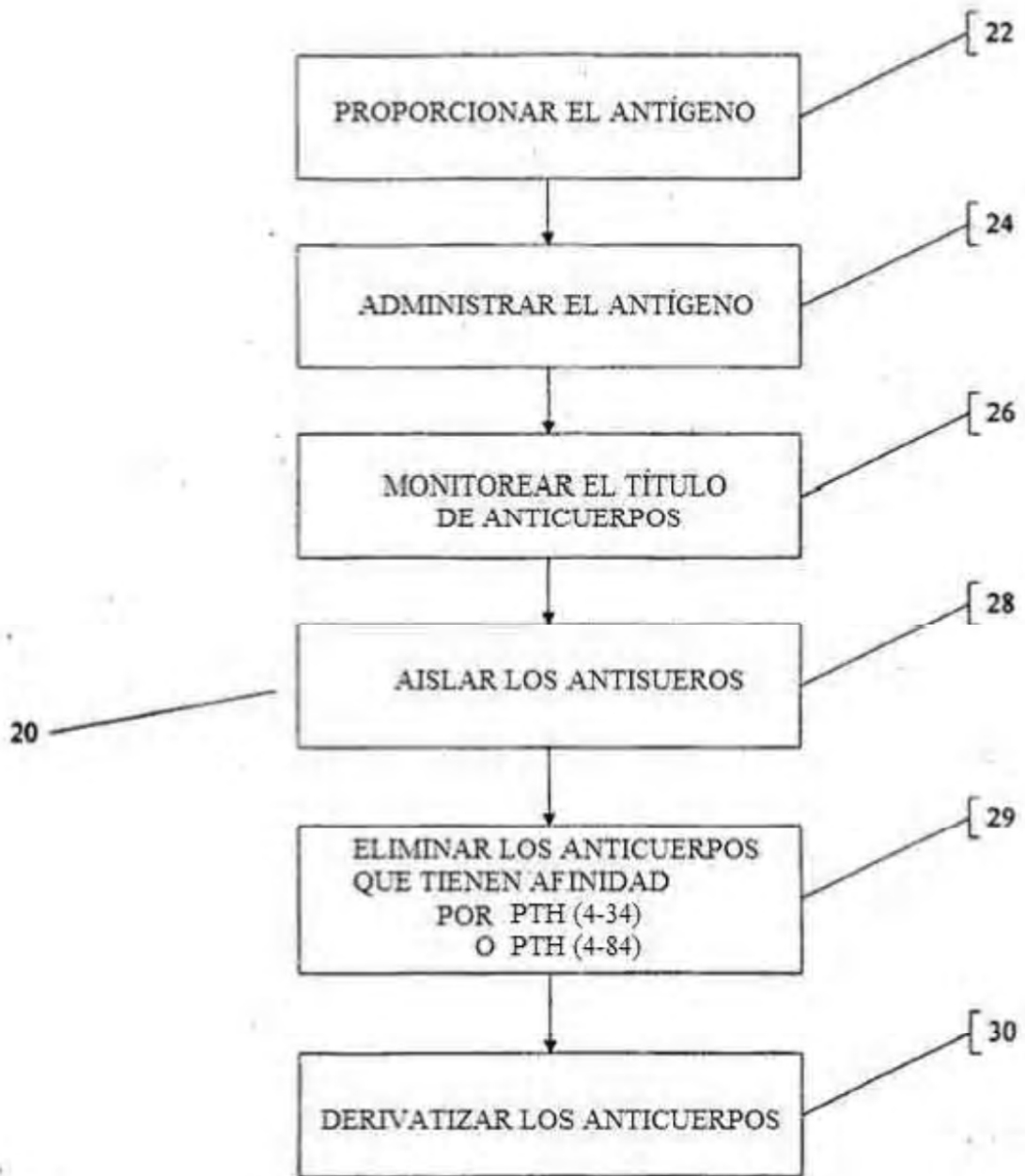


FIGURA 4