

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 487**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/07 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06712413 .1**
96 Fecha de presentación: **26.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1852442**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Anticuerpo para el análisis de la actividad de la ADAMTS13 y método de análisis de la actividad**

30 Prioridad:
14.02.2005 JP 2005036612
30.05.2005 JP 2005157530

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73 Titular/es:
ALFRESA PHARMA CORPORATION
2-9, KOKUMACHI 2-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI OSAKA 540-8575, JP

72 Inventor/es:
KATO, Seiji;
HIURA, Hisahide;
FUJIMURA, Yoshihiro y
MATSUMOTO, Masanori

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 382 487 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

Anticuerpo para el análisis de la actividad de la ADAMTS13 y método de análisis de la actividad.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo, en particular a un anticuerpo monoclonal, que presenta reactividad (afinidad) específica por un sitio determinante antigénico producido por la reacción de una enzima que escinde el factor de Von Willebrand (a la que se hace referencia en adelante como "ADAMTS13") con el factor (al que se hace referencia en adelante a veces como "VWF") o con un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, pero que no presenta una reactividad específica al VWF o al péptido sin la influencia proporcionada por la ADAMTS13; a un método para producirlo; y al uso del mismo.

15 La presente solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes japonesas de patente nº 2005-036612 y 2005-157530.

Antecedentes de la técnica

20 La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es un síndrome caracterizado, por ejemplo, por trombocitopenia, anemia hemolítica y disfunción neurológica grave. En el pasado era una enfermedad de diagnóstico desfavorable con una tasa de mortalidad próxima al 80% entre los pacientes en los 3 meses siguientes al diagnóstico. Sin embargo, el diagnóstico ha mejorado considerablemente en la actualidad gracias al intercambio de plasma.

25 Recientemente se ha publicado que la PTT podría atribuirse a un descenso en la actividad de la enzima de escisión del VWF (ADAMTS13). En concreto, se ha descubierto la presencia de un inhibidor de tipo IgG contra la enzima de escisión del VWF que disminuye la actividad de dicha enzima, provocando la PTT adquirida (documentos no de patente nº 1 y 2). Además, se ha demostrado que el síndrome de Upshaw-Schulman (SUS), una PTT congénita, se caracteriza por una deficiencia genética de la enzima de escisión del VWF (documento no patentado nº 3). Se ha demostrado que el gen que codifica esta enzima de escisión del VWF es el ADAMTS13 (documentos no de patente nº 4 y 5).

30 La enzima ADAMTS13 es una metaloproteasa de cinc que escinde la subunidad del VWF específicamente en la unión Tyr842-Met843. La actividad de esta enzima se mide mediante un análisis de multímeros del VWF en el que este factor se utiliza como sustrato para detectar los fragmentos derivados del mismo mediante una electroforesis. Este método presenta la ventaja de permitir una medición exacta de la actividad de la ADAMTS13, pero resulta complicado de ejecutar, de ahí que sea deseable desarrollar un método de medición que, sobre todo, sea más sencillo.

35 Los documentos no de patente nº 6 a 8 informan de un método en el que el dominio A2 del VWF o una fracción del mismo se usa como sustrato para la ADAMTS13 con el fin de medir la actividad de esta última. No son sustratos naturales, sino que se expresan en *E. coli* por recombinación genética. Dado que estos sustratos son degradados por la ADAMTS13 presente en muestras de plasma, los métodos de medición descritos anteriormente detectan estos sustratos por su peso molecular mediante electroforesis y transferencia Western, y después hacen reaccionar dichos sustratos con la enzima para medir inmunológicamente los sustratos restantes no degradados, para así detectar y determinar la actividad de la ADAMTS13. Sin embargo, como estos métodos usan una correlación inversa entre la actividad de la ADAMTS13 y la intensidad observada de la señal, y su curva estándar adopta un gradiente negativo, no son capaces de proporcionar reproducibilidades y sensibilidades adecuadas en la región clínicamente importante del 5% o inferior, lo cual supone un problema todavía sin resolver.

40 Con el propósito de abordarlo, se ha publicado un método para medir la actividad de la ADAMTS13 del plasma mediante un sustrato fluorescente extinguido (documento no de patente nº 9). Este método contiene una curva estándar que cubre un gradiente positivo donde la intensidad de la fluorescencia aumenta a medida que la actividad de la ADAMTS13 aumenta. Sin embargo, el método presenta un problema para su uso en un laboratorio clínico general: requiere un costoso sustrato sintetizado químicamente de manera especial para efectuar un ensayo de frecuencia con un fluorómetro. El documento WO 2005/008241 A1 se refiere a métodos y sistemas para la detección de multímeros del VWF. El documento WO 2005/008241 A1 describe anticuerpos dirigidos contra el factor VWF entero.

60 [Documento no de patente nº 1] New Engl. J. Med. 339, 1578-1584, 1998

[Documento no de patente nº 2] New Engl. J. Med. 339, 1585-1594, 1988

[Documento no de patente nº 3] J. Hematol. 74, 101-108, 2001

[Documento no de patente nº 4] J. Biochem. 130, 475-480, 2001

[Documento no de patente nº 5] J. Biol. Chem. 276, 41059-41063, 2001

[Documento no de patente nº 6] Blood, 103, 607-612, 2004

65 [Documento no de patente nº 7] J. Thromb. Haemost. 2, 485-491, 2004

[Documento no de patente nº 8] Thromb Haemost. 91, 806-811, 2004

[Documento no de patente nº 9] The Journal of Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, 15, 421, 2004

Descripción de la invención

5 (Problemas que deben resolverse)

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un anticuerpo útil para medir la actividad de la ADAMTS13. Más específicamente, el objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un anticuerpo con afinidad por un péptido producido por la hidrólisis del factor VWF con la enzima ADAMST13, pues dicho factor es un sustrato de dicha enzima, o el péptido parcial del VWF, que puede servir de sustrato de esa misma enzima, así como un uso del anticuerpo de interés y el anticuerpo de interés en forma de anticuerpo monoclonal. Además, otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una línea celular de hibridoma que produzca el anticuerpo monoclonal de interés.

15 (Medios para resolver los problemas)

Los inventores de la presente invención estudiaron detalladamente la forma de encontrar un método para medir la actividad de la ADAMTS13 y, fruto de ello, lograron que un péptido, cuyo lado del extremo C contiene una secuencia de aminoácidos situada hacia el lado del extremo N en relación con un sitio de escisión específico que la ADAMTS13 reconoce en el VWF o en el péptido parcial del mismo que puede ser usado como sustrato, fuera usado como antígeno para producir un anticuerpo monoclonal que podía reconocer específicamente un sitio determinante antigénico producido por la escisión del sustrato con la ADAMTS13, estableciendo a partir de ahí una línea celular de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal de interés y hallando además un uso para este anticuerpo monoclonal de interés.

25 En resumen, la presente invención se compone de lo siguiente:

1. Un anticuerpo que presenta reactividad (afinidad) específica hacia un sitio determinante antigénico producido por la reacción de la enzima de escisión del VWF ADAMTS13 con el factor de Von Willebrand (VWF) o un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, pero que no presenta reactividad específica frente al VWF o la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, donde el determinante antigénico es un péptido que comprende en su extremo C la secuencia de aminoácidos: Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr.
2. El anticuerpo según el aspecto 1 anterior, donde el determinante antigénico producido por la reacción de la ADAMTS13 con el VWF o con el péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias es un sitio determinante antigénico producido por la escisión del VWF o del péptido con la ADAMTS13.
3. El anticuerpo según los aspectos 1 o 2 anteriores, donde el determinante antigénico está presente en un nuevo fragmento de péptido hacia el extremo N de un sitio de escisión producido por la escisión del VWF o del péptido con la ADAMTS13.
4. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 3 anteriores, donde el anticuerpo presenta reactividad al péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias.
5. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 4 anteriores, donde el anticuerpo presenta reactividad a un dominio que comprende por lo menos 4 residuos de aminoácidos del extremo C del péptido representado por la SEC ID nº 2 del listado de secuencias.
6. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 5 anteriores, donde el anticuerpo presenta reactividad al péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias, pero no presenta reactividad a ninguno de los péptidos representados por las SEC ID nº 3 a 8 proporcionadas en el listado de secuencias.
7. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 6 anteriores, cuya reactividad al péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es por lo menos cinco veces más fuerte que su reactividad al VWF purificado de plasma humano.
8. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 7 anteriores, cuya reactividad al péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es por lo menos tres veces más fuerte que su reactividad a un péptido con la secuencia representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias.
9. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 8 anteriores, cuya reactividad al péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es por lo menos cinco veces más fuerte que su reactividad al péptido representado por la SEC ID nº 8 proporcionada en el listado de secuencias.

10. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 9 anteriores, donde un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 9 proporcionada en el listado de secuencias en su extremo C es usado como inmunógeno para proporcionar el anticuerpo.
- 5 11. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 10 anteriores, donde un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es usado como inmunógeno para proporcionar el anticuerpo.
- 10 12. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 11 anteriores, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
13. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 11 anteriores, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma con número de registro FERM BP-10480 o FERM BP-10479.
- 15 14. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de acuerdo con el aspecto 12 anterior.
15. El hibridoma de acuerdo con el aspecto 14 anterior, donde el hibridoma tiene un número de registro FERM BP-10480 o FERM BP-10479.
- 20 16. Un método para medir la actividad de la ADAMTS13, que comprende las etapas siguientes:
- la reacción de un péptido, que actúa como sustrato escindible por la ADAMTS13, con una muestra para analizar la actividad de la ADAMTS13, y
- 25 la reacción del producto de reacción de la etapa anterior con por lo menos un anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 13 anteriores.
17. Un método para medir la actividad de la ADAMTS13 de una muestra, que comprende las etapas siguientes:
- 30 la reacción de un péptido con la secuencia representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias con una muestra para analizar la actividad de la ADAMTS13, y la reacción del producto de reacción de la etapa anterior con por lo menos un anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 13 anteriores.
- 35 18. Un método para medir la actividad de la ADAMTS13 de una muestra que comprende las etapas siguientes:
- la reacción del VWF con una muestra para analizar la actividad de la ADAMTS13, y
- la reacción del producto de reacción de la etapa anterior con por lo menos un anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 13 anteriores.
- 40 19. El método para medir la actividad de la ADAMTS13 de una muestra según cualquiera de los aspectos 16 a 18 anteriores, donde el anticuerpo es marcado con material de marcado .
- 45 20. El método para medir la actividad de la ADAMTS13 de una muestra según cualquiera de los aspectos 16 a 19 anteriores, donde el anticuerpo se inmoviliza en un soporte sólido.
21. El método para medir la actividad de la ADAMTS13 en una muestra según cualquiera de los aspectos 16 a 20 anteriores, donde el anticuerpo es soportado sobre una partícula insoluble en agua.
- 50 22. Un método para examinar la enfermedad microangiopática por el método según cualquiera de los aspectos 16 a 21 anteriores.
23. Un reactivo o un kit que comprende el anticuerpo según cualquiera de los aspectos 1 a 13 anteriores.

55 (Efectos de la invención)

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que reconoce específicamente un sitio determinante antigénico producido por la reacción de la ADAMTS13 con el VWF o con un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias. Además, el anticuerpo de interés no presenta reactividad específica significativa al VWF o al péptido sin la influencia de la ADAMTS13. El anticuerpo de interés puede usarse para medir y analizar la actividad enzimática de la ADAMTS13. A saber, el anticuerpo de la presente invención puede usarse para: (1) medir de forma rápida y sencilla la actividad de la ADAMTS13 mediante inmunoanálisis en sándwich; y (2) medir de forma rápida y sencilla la actividad de la ADAMTS13 mediante inmunoensayo de marcado de partículas. Por ello, la presente invención presenta importantes implicaciones porque: (3) dichos resultados de medición pueden usarse como base para desarrollar fármacos terapéuticos y de diagnóstico y similares. Además, el anticuerpo de la presente invención puede producirse de forma

estable a partir de células fusionadas monoclonadas, por lo que es de gran valor para su aplicabilidad industrial.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra una curva estándar para medir la actividad de la ADAMTS13 usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención como un anticuerpo secundario y el resultado de la medición del caso de SUS. (Ejemplos 7 y 8)

10 La figura 2 muestra una curva estándar para medir la actividad de la ADAMTS13 usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención en soportes sólidos. (Ejemplo 9)

Descripción de la forma de realización preferida

15 En la presente invención, el anticuerpo incluye tanto anticuerpos monoclonales como policlonales. El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido a partir de células fusionadas monoclonadas preparadas mediante un método bien conocido. El anticuerpo de la presente invención también incluye tanto una molécula entera de anticuerpo como una fracción de la molécula del anticuerpo provista de la actividad del anticuerpo. El antígeno destinado a servir como inmunógeno para la producción del anticuerpo de la presente invención no está limitado en particular siempre que pueda servir para solucionar el problema de la presente invención, pero preferiblemente se usan péptidos, y los péptidos de interés incluyen los unidos a proteínas transportadoras. Además, en la presente memoria "péptido" representa a los formados con dos o más aminoácidos unidos por enlace(s) peptídico(s).

20 La ADAMTS13 es una metaloproteasa de cinc que escinde específicamente el enlace entre la tirosina 1605 (Tyr1605) y la metionina 1606 (Met1606) de la molécula del VWF. El VWF resulta así dividido y proporciona nuevos extremos C y N en la secuencia de aminoácidos, lo que permite generar nuevos sitios determinantes antigénicos. Por lo tanto, cabe esperar la fabricación de un anticuerpo que pueda reconocer dichos sitios determinantes antigénicos y ser capaz así de unirse específicamente a un VWF escindido. El anticuerpo de la presente invención no está limitado en particular siempre que presente una reactividad específica hacia un sitio determinante antigénico situado en un nuevo péptido hacia el extremo N del sitio de escisión. Según el documento no de patente nº 6, se ha informado de que la ADAMTS13 considera un péptido situado entre Asp 1459 y Arg 1668 en la molécula de VWF como su sustrato para escindir específicamente el enlace entre Tyr1605-Met1606. En particular, la bibliografía anterior demostró que un péptido compuesto de los 73 aminoácidos comprendidos entre Asp 1596 y Arg 1668 (al que se hace referencia en adelante como "VWF73", que es el péptido representado por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias) es hidrolizado eficazmente por la ADAMTS13. El VWF73 compuesto del péptido representado por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias sufre en presencia de la ADAMTS13 una hidrólisis entre la 10ª Tyr y la 11ª Met, liberando un péptido compuesto de 10 aminoácidos que está situado hacia el extremo N del sitio de escisión. El péptido de 10 aminoácidos situado hacia ese extremo N también se denominará en adelante "péptido N-10", y su secuencia de aminoácidos corresponde a la SEC ID nº 2 representada en el listado de secuencias.

40 El péptido N-10 descrito anteriormente también podría usarse como un inmunógeno para el anticuerpo de la presente invención que tiene una reactividad específica hacia un sitio determinante antigénico producido por la reacción de la enzima de escisión del VWF (ADAMTS13) con el factor de Von Willebrand (VWF) o con un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el del listado de secuencias, pero que no presenta una reactividad específica significativa hacia el VWF o el péptido descrito anteriormente sin la influencia de la ADAMTS13. En el contexto de la presente invención, el VWF o el péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias que no ha sufrido la influencia ni la escisión por la ADAMTS13 suele denominarse "molécula VWF entera". Además, puede servir cualquier péptido poseedor de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias siempre que pueda ser hidrolizado por la ADAMTS13, e incluya entre 73 y 2050 aminoácidos, preferiblemente entre 73 y 210, y más preferiblemente la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias (73 aminoácidos).

55 El anticuerpo de la presente invención así obtenido reconoce un sitio determinante antigénico producido por la reacción de la ADAMTS13 con el VWF o con un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias y no presenta reactividad significativa con la molécula VWF entera.

60 Como ejemplo de tal determinante antigénico, podría mencionarse un sitio determinante antigénico que se encuentra en un fragmento de péptido hacia el extremo N (péptido de SEC ID nº 2) producido mediante la hidrólisis del péptido representado por la SEC ID nº 1 con la ADAMTS13. Es esencial que el determinante antigénico situado hacia el extremo N contenga tirosina (Tyr) en el extremo C. Además, el péptido de la SEC ID nº 2 sigue presentando antigenicidad aunque carezca de un aminoácido en el extremo N, pero no cuando carece de dos aminoácidos. Por lo tanto, se sospecha que el determinante antigénico situado hacia el extremo N descrito anteriormente presenta una estructura plegada compuesta de por lo menos 9 aminoácidos.

65

Además, “no presenta reactividad significativa” significa que el anticuerpo no presenta afinidad significativa hacia la molécula VWF entera, de forma que aunque entren en contacto no producirán señal alguna excepto la de fondo (señal obtenida cuando el anticuerpo no está presente o cuando el anticuerpo presente es irrelevante para el análisis) cuando sean analizados para detectar una señal mediante un método inmunológico conocido, como la transferencia Western o el ensayo ELISA.

El anticuerpo de la presente invención presenta preferiblemente una de las siguientes propiedades: (a) el anticuerpo presenta una reactividad por lo menos cinco veces mayor con el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias que con el VWF purificado de plasma humano, inmovilizados en pocillos de microplacas, cuando se hace reaccionar al anticuerpo con el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias o con el VWF purificado de plasma humano, respectivamente; (b) el anticuerpo presenta una reactividad por lo menos tres veces mayor con el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias que con el péptido con la secuencia representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, inmovilizados en pocillos de microplacas, cuando se hace reaccionar al anticuerpo con el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias o con el péptido con la secuencia representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, respectivamente; y (c) el anticuerpo presenta una reactividad por lo menos cinco veces mayor con el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias que con el péptido con la secuencia representada por la SEC ID nº 8 proporcionada en el listado de secuencias, inmovilizados en pocillos de microplacas, cuando se hace reaccionar al anticuerpo con el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias o con el péptido con la secuencia representada por la SEC ID nº 8 proporcionada en el listado de secuencias, respectivamente.

Estas propiedades (a) a (c) pueden confirmarse usando el método descrito a continuación en los ejemplos 5 a 8.

Cuando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, el anticuerpo monoclonal de interés se prepara con un método habitual en la técnica. A saber, se produce mediante la fusión de una célula productora de anticuerpos con afinidad específica hacia un antígeno (por ejemplo, el péptido N-10) con una célula de mieloma para formar un hibridoma, que se clona para seleccionar un clon que produce un anticuerpo específico para cada proteína.

Como antígeno, por ejemplo, se puede usar el péptido N-10 entero, o ese mismo péptido desprovisto de uno o varios aminoácidos o bien con aminoácidos sustituidos o añadidos, siempre que contenga por lo menos tirosina (Tyr) en el extremo C y presente antigenicidad. Se cree que el determinante antigénico está compuesto de por lo menos 4 aminoácidos, y preferiblemente de 9 o más.

El antígeno de interés puede ser sintetizado o preparado con métodos de ingeniería genética partiendo de la secuencia parcial de aminoácidos seleccionada. El antígeno peptídico obtenido puede suspenderse o disolverse directamente en un tampón adecuado tal como un tampón de fosfato (PBS) para ser usado como antígeno de sensibilización. El antígeno estará preferiblemente unido (por entrecruzamiento) a una proteína transportadora adecuada tal como la albúmina y la hemocianina de lapa californiana para obtener una antigenicidad más fuerte. La solución de antígeno suele prepararse para que presente una concentración de aproximadamente entre 50 y 500 µg/ml de componente antigénico. Entre los animales que se sensibilizan inmunológicamente con el antígeno de interés se incluyen: ratones, ratas, caballos, cabras y conejos. Se prefiere el ratón, en particular el ratón BALB/c. En ese momento, con el fin de inmunizar a un animal para obtener una respuesta mejorada al antígeno, la solución del antígeno de interés puede mezclarse con un adyuvante para su administración. Como ejemplos de adyuvantes que pueden ser usados en la presente invención, pueden mencionarse: adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA), Ribi (MPL), Ribi (TDM), Ribi (MPL+TDM), vacuna contra *Bordetella pertussis*, muramil-dipéptido (MDP), adyuvante de aluminio (ALUM) y una combinación de los mismos. Se prefieren particularmente la combinación con FCA en la inmunización primaria y la combinación con FIA en la inmunización adicional.

Para el método de inmunización, los sitios de inyección, el calendario y similares pueden modificarse según proceda según, por ejemplo, el tipo de antígeno que se vaya a usar y la presencia de adyuvante que se vaya a mezclar. Por ejemplo, los ratones utilizados como animal de inmunización reciben inyecciones de entre 0,05 y 1 ml de solución de antígeno mezclada con un adyuvante (entre 10 y 200 µg de componente antigénico incluido) por vía intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o venosa (a través de la cola), y vuelven a ser inmunizados entre una y cuatro veces cada cuatro a catorce días tras la inmunización primaria, hasta acabar siendo inmunizados por última vez entre una y cuatro semanas después. Si se utiliza una solución de antígeno sin adyuvante, ésta puede administrarse por vía intraperitoneal aumentando en tal caso la cantidad de antígeno. Entre cinco y seis días después de la inmunización adicional, se recoge sangre para medir el título de anticuerpos. El título de anticuerpos puede medirse con un método usado habitualmente en la técnica según un análisis de anticuerpos descrito a continuación. Aproximadamente entre el 3^{er} y el 5^o día después de la última inmunización, los esplenocitos se extraen de los animales inmunizados para obtener las células productoras de anticuerpos.

Como células de mieloma, se usan, por ejemplo, las derivadas de ratón, rata y humano. Como ejemplos de células

de mieloma de ratón, se pueden mencionar P3X63-Ag8, P3X63-Ag8-U1, P3NS1-Ag4, SP2/0-Ag14, P3X63-Ag8-653 y similares, pero es preferible usar un mismo tipo de animal, en particular una misma línea de animal, para obtener las células productoras de antígeno y las células de mieloma. Las células de mieloma pueden criopreservarse o mantenerse mediante el subcultivo en un medio común provisto de suero de caballo, conejo o fetal bovino. Para la fusión de células, se prefiere el uso de células en fase de crecimiento logarítmico.

Como ejemplos de método para formar hibridomas mediante la fusión de células productoras de anticuerpos con células de mieloma, se pueden mencionar los métodos que utilizan, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), virus Sendai y aparatos de electrofusión. Por ejemplo, en el método PEG, los esplenocitos y las células de mieloma se pueden suspender en un tampón o medio de cultivo adecuado que contenga aproximadamente entre el 30 y el 60% de PEG (con un peso molecular medio de entre 1.000 y 6.000) para mezclar en una proporción de 1-10:1, y preferiblemente de 5-10:1, y después permitir que reaccionen entre aproximadamente 30 segundos y 3 minutos a una temperatura de entre 25 y 37°C y a un pH de entre 6 y 8. Una vez finalizada la reacción, las células se separan de la solución de PEG, se vuelven a suspender en el medio de cultivo y se colocan en las placas de pocillos para células para proseguir el cultivo.

Las células sujetas a la fusión se cultivan en un medio de selección para seleccionar los hibridomas. El medio de selección es un medio que permite que las cepas de células originales mueran y sólo proliferen las células fusionadas; suele usarse el medio de hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT). Los hibridomas son seleccionados en primer lugar mediante la sustitución de una parte, preferiblemente aproximadamente la mitad, del medio de cultivo con medio de selección fresco, normalmente entre 1 y 7 días después de la fusión, y la posterior sustitución, de la misma forma, repetidas veces cada varios días para continuar el cultivo. Los pocillos se observan con microscopio para confirmar el crecimiento de las colonias.

Pueden recogerse y analizarse los sobrenadantes del cultivo para confirmar si los hibridomas en crecimiento producen los anticuerpos deseados o no. Por ejemplo, cuando el péptido N-10 se usa como un antígeno, al péptido N-10 inmovilizado se le puede añadir el sobrenadante de cultivo para que reaccione, y añadirse además un anticuerpo secundario (como sueros de antiglobulina, anti-IgM y anti-IgG) marcado con, por ejemplo, sustancias fluorescentes, enzimas y RI para su reacción, midiéndose así el título de anticuerpos. Los pocillos que producen un anticuerpo adecuado se obtienen de esta manera. A continuación, al péptido representado por la SEC ID nº 8 proporcionada en el listado de secuencias (en adelante también denominado "péptido N-15") que ha sido inmovilizado simultáneamente se le añade el sobrenadante para su reacción, midiéndose así el título de anticuerpos de la misma forma. Las señales de los péptidos N-10 y N-15 se comparan para seleccionar el péptido N-10 cuyas señales son por lo menos 10 veces más fuertes que las del N-15. Además, los monoclonos se separan mediante un método que utiliza, por ejemplo, diluciones límite, análisis en agar blando y separador celular activado por fluorescencia. Por ejemplo, en la dilución límite, las colonias de hibridoma pueden diluirse en serie con un medio para obtener aproximadamente 1 célula/pocillo, y cultivarse para aislar un clon que produzca el anticuerpo monoclonal deseado. Los hibridomas productores de anticuerpos obtenidos pueden congelarse con un agente crioprotector tal como aproximadamente un 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerina para almacenarse a temperaturas de entre -70 y -196° C durante un periodo de entre medio año hasta de forma semipermanente. Las células se descongelan rápidamente en un baño termostático calentado a unos 37°C antes de su uso. Es aconsejable lavarlas bien antes de su uso para eliminar cualquier resto de agente crioprotector, que puede resultar citotóxico.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención obtenidos con el método descrito anteriormente son, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de la clase IgG o IgM derivados de ratón, y se designan "Ac. del péptido del VWF N10-116" (VWF-peptide Ab N10-116) y "Ac. del péptido del VWF N10-146" (VWF-peptide Ab N10-146). La subclase de anticuerpo producido por hibridoma puede examinarse cultivando el hibridoma en condiciones normales y analizando la clase de anticuerpo secretado en el sobrenadante del cultivo mediante, por ejemplo, un kit comercial fabricado para determinar la clase o subclase de anticuerpo.

De los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de la presente invención, las líneas de los hibridomas del Ac. del péptido del VWF N10-116 y del Ac. del péptido del VWF N10-146, que producen anticuerpos monoclonales Ac. del péptido del VWF N10-116 y Ac. del péptido del VWF N10-146, han sido separadas por primera vez por los inventores de la presente invención, y específicamente, se han depositado a nivel nacional en el Patent Organism Depository Center del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; Central No. 6 1-1-1 Higasi, ciudad de Tsukuba, prefectura de Ibaraki; código postal 305-8566), que es una institución internacional de depósito basada en el Tratado de Budapest, del 29 de marzo de 2005, obteniendo los números de registro FERM P-20483 y FERM P-20482, y depositados después a nivel internacional, obteniendo los números de registro FERM BP-10479 y FERM BP-10480.

El método para obtener el anticuerpo monoclonal puede escogerse adecuadamente entre la recogida de líquido peritoneal de ratón o el cultivo celular, dependiendo de la cantidad requerida, la naturaleza del hibridoma o factores similares. Los hibridomas capaces de proliferar en la cavidad peritoneal del ratón pueden obtenerse a una concentración elevada de varios mg por mililitro a partir del líquido peritoneal. Los hibridomas que no pueden cultivarse *in vivo* pueden obtenerse a partir del sobrenadante de un cultivo celular. El cultivo celular ofrece como

ventajas menos contaminación por inmunoglobulinas y otros contaminantes presentes en la cavidad peritoneal así como una purificación más sencilla, aunque produce menos cantidad de anticuerpo que el método *in vivo*.

Si se opta por obtener los anticuerpos monoclonales a partir de la cavidad peritoneal del ratón, por ejemplo, los hibridomas (aproximadamente más de 10^6) se trasplantan en cavidades peritoneales de ratones BALB/c a los que previamente se ha administrado una sustancia con efectos inmunodepresores como el pristano (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano), para recoger los líquidos peritoneales acumulados entre 1 y 3 semanas después. En el caso de los hibridomas heterólogos (por ejemplo, entre ratón y rata), se prefiere el uso de ratones atímicos y ratones tratados con radiación.

Para obtener anticuerpos de un sobrenadante de cultivo celular se usan métodos de cultivo para cultivar los hibridomas de interés como el método de cultivo estático usado para el mantenimiento de células, el método de cultivo de alta densidad o el método de cultivo en frasco giratorio, obteniéndose así el sobrenadante del cultivo que contiene el anticuerpo. El suero contiene otros anticuerpos y contaminantes como la albúmina, lo que acarrea muchos inconvenientes a la hora de purificar el anticuerpo. Por eso es aconsejable añadir la menor cantidad posible de suero al medio de cultivo.

Es sencillo purificar los anticuerpos monoclonales procedentes del líquido peritoneal o del sobrenadante de cultivo mediante la aplicación de un fraccionamiento como el método de extracción mediante sales de sulfato de amonio o sulfato de sodio, el método del polietilenglicol, el método del etanol, la cromatografía de intercambio de iones con DEAE, y la filtración con gel, que son métodos habituales para la purificación de inmunoglobulinas. Además, cuando el anticuerpo antimonoclonal de la presente invención es un anticuerpo IgG de ratón, puede efectuarse fácilmente la purificación mediante cromatografía de afinidad usando soportes de unión a proteína A o a inmunoglobulina antiratón.

La actividad de la ADAMTS13 en una muestra puede medirse rápidamente con el anticuerpo novedoso de la presente invención. El factor VWF, que es un sustrato natural de la ADAMTS13, también puede usarse para la medición. Además, puede usarse como sustrato el péptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 1 proporcionada en el listado de secuencias y compuesto de entre 73 y 2.050 aminoácidos, preferiblemente entre 73 y 210 aminoácidos, y más preferiblemente el péptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n° 1 (VWF73). Estos sustratos se marcan preferiblemente con, por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST) en el extremo N de la molécula de sustrato mediante un método de ingeniería genética antes de que se prepare la expresión (en adelante denominado también "sustrato GST-VWF73"). Además, puede usarse VWF73 marcado con una enzima en su extremo N, por ejemplo, sustrato VWF73 marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en su extremo N. Puede prepararse sustrato VWF73 marcado con HRP mediante la adición de varios aminoácidos en el extremo N del péptido VWF73, a uno de los cuales se le hace entonces mutar a cisteína (Cys) para ser marcado con HRP (J. Thromb. Haemost., 4, 129-136, 2006). A continuación, estos VWF73 preparados para su uso como sustratos serán a veces denominados genéricamente "sustrato VWF73".

El sustrato de interés se hace reaccionar durante un periodo definido con una muestra para medir la actividad de la ADAMTS13 mediante el análisis de los productos que contienen la fracción (como el péptido N-10 cuando el sustrato VWF73 es usado como sustrato) producida en la mezcla de reacción de sustrato-enzima. El método de medición no está limitado siempre que se use el anticuerpo de la presente invención. Para el método pueden aplicarse diversos inmunoensayos utilizados habitualmente en la técnica. Tales métodos no están particularmente limitados siempre que el método comprenda las etapas de reacción de la mezcla de reacción de sustrato-enzima con el anticuerpo de la presente invención para medir el inmunoconjugado formado, e incluyen el análisis inmunonefelométrico que detecta ópticamente una reacción de aglutinación o precipitación, o el inmunoensayo de marcado que usa un anticuerpo marcado con una sustancia que permite una discriminación sencilla.

El inmunoensayo de marcado incluye, por ejemplo, el radioinmunoensayo que utiliza RI como marca para detectar inmunoconjugados, el inmunoensayo enzimático que utiliza una enzima como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina y el inmunoensayo por fluorescencia que utiliza una sustancia fluorescente. Dependiendo del sujeto que se vaya a marcar, es posible usar el método directo en el que el anticuerpo que se va a detectar se marca directamente, el método indirecto en el que se marca un anticuerpo del anticuerpo que se quiere detectar, es decir, un anticuerpo secundario, y similares. Si se usa el método indirecto y, por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal IgG de ratón, es posible usar un anticuerpo policlonal IgG antiratón como anticuerpo secundario. Para preparar el anticuerpo secundario y para marcar el anticuerpo con una sustancia fluorescente, RI, enzima o similar, se pueden aplicar métodos usados habitualmente en la técnica. Además, también se pueden utilizar métodos que usan la reacción de biotina-avidina (o estreptavidina) como método de medición de interés, y se seleccionan preferiblemente en una medición que requiere alta sensibilidad. El método de interés incluye un método en el que el anticuerpo de la presente invención marcado con biotina se combina con estreptavidina marcada con una sustancia fluorescente. Para marcar el anticuerpo de la presente invención con biotina y la estreptavidina con una sustancia fluorescente se pueden utilizar métodos habituales en la técnica, y, por ejemplo, la estreptavidina marcada con una sustancia fluorescente o similar está disponible comercialmente.

En la presente invención, los anticuerpos policlonales pueden prepararse de la siguiente manera. El mismo antígeno

que el del anticuerpo monoclonal se aplica a un animal que puede ser un conejo, una cabra, una oveja, una rata o un ratón para su inmunización y la obtención de un antisuero. Puesto que el antisuero obtenido normalmente contiene anticuerpos que inducen reacciones inespecíficas, se usa una sustancia tal como suero humano, VWF humano, o VWF73, que podría causar reacciones inespecíficas, para absorberlos, potenciando así la especificidad. Además, también se pueden obtener anticuerpos con una alta especificidad y adecuados para el objetivo de la presente invención mediante la purificación por afinidad con el inmunógeno utilizado. Los anticuerpos obtenidos pueden usarse para medir la actividad de la ADAMTS13 como en el caso del anticuerpo monoclonal.

Los ejemplos específicos del método para medir la actividad de la ADAMTS13 mediante el anticuerpo de la presente invención se explican a continuación. Se describen los métodos para medir la actividad de la ADAMTS13 en los que un anticuerpo monoclonal que se obtiene usando el péptido N-10 como inmunógeno (en adelante también denominado "anticuerpo monoclonal anti-N-10") se usa como el anticuerpo de la presente invención, y el sustrato GST-VWF73 mencionado anteriormente es usado como sustrato, aunque el anticuerpo y el sustrato no están limitados en particular a los descritos anteriormente siempre que el anticuerpo sea un anticuerpo de la presente invención y el sustrato un péptido hidrolizable por la ADAMTS13.

1. Un anticuerpo anti-GST se inmoviliza en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase de anticuerpos anti-GST, donde el sustrato GST-VWF73 se fija para preparar una fase sólida. Se hacen reaccionar una muestra y un tampón de reacción con la fase sólida, y a continuación se hace reaccionar el anticuerpo monoclonal anti-N-10 para medir la cantidad del mismo que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
2. Un anticuerpo anti-GST se inmoviliza en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase de anticuerpos anti-GST, donde el sustrato GST-VWF73 se fija para preparar una fase sólida. Un tampón de reacción, una muestra, y el anticuerpo monoclonal anti-N-10 se hacen reaccionar simultáneamente con la fase sólida, para medir la cantidad de dicho anticuerpo capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
3. Se inmoviliza un anticuerpo anti-GST en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase anti-GST, con la que se hace reaccionar el sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción y una muestra, y después el anticuerpo monoclonal anti-N-10 se hace reaccionar para medir la cantidad de dicho anticuerpo que resulta atrapado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
4. Se inmoviliza un anticuerpo anti-GST en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase anti-GST, con la que el sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción, una muestra, y el anticuerpo monoclonal anti-N-10 se hacen reaccionar simultáneamente para medir la cantidad de dicho anticuerpo que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
5. El sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción y una muestra se hacen reaccionar en un recipiente tal como un tubo de ensayo para preparar una mezcla de reacción, que entonces se hace reaccionar con el anticuerpo anti-GST inmovilizado previamente en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética, y después se hace reaccionar con un anticuerpo monoclonal anti-N-10 para medir la cantidad de dicho anticuerpo que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
6. El sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción, una muestra, y anticuerpo monoclonal anti-N-10 se hacen reaccionar en un recipiente tal como un tubo de ensayo para preparar una mezcla de reacción, que entonces se hace reaccionar con el anticuerpo anti-GST inmovilizado previamente en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética, para medir la cantidad de anticuerpo monoclonal anti-N-10 que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
7. El sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción y una muestra se hacen reaccionar en un recipiente tal como un tubo de ensayo para preparar una mezcla de reacción, que entonces se hace reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 inmovilizado previamente en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética, y después se hace reaccionar con un anticuerpo anti-GST para medir la cantidad de dicho anticuerpo que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13. El anticuerpo anti-GST se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.

- 5 8. El sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción, una muestra, y anticuerpo anti-GST se hacen reaccionar en un recipiente tal como un tubo de ensayo para preparar una mezcla de reacción, que entonces se hace reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 inmovilizado previamente en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética, para medir la cantidad del anticuerpo anti-GST atrapado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13. El anticuerpo anti-GST se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido.
- 10 9. Se inmoviliza el anticuerpo monoclonal anti-N-10 en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase de anticuerpo monoclonal anti-N-10, con la que se hacen reaccionar simultáneamente el sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción, y una muestra y después un anticuerpo anti-GST se hace reaccionar para medir la cantidad de dicho anticuerpo que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra. El anticuerpo anti-GST se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido. Además, el anticuerpo anti-GST puede hacerse reaccionar previamente con sustrato GST-VWF73 como un ejemplo del presente método de medición.
- 15 10. Se inmoviliza el anticuerpo monoclonal anti-N-10 en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase de anticuerpo monoclonal anti-N-10, con la que se hacen reaccionar simultáneamente el sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción, una muestra, y un anticuerpo anti-GST para medir la cantidad de este anticuerpo que resulta capturado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra. El anticuerpo anti-GST se marca preferiblemente con un material de marcado bien conocido. Además, el anticuerpo anti-GST puede hacerse reaccionar previamente con sustrato GST-VWF73 como un ejemplo del presente método de medición.
- 20 11. El anticuerpo anti-GST se inmoviliza en una micropartícula detectable visual o físicamente tal como una partícula de oro coloidal o una partícula de látex coloreada, y se hace reaccionar con el sustrato GST-VWF73, y a continuación se le añade un tampón de reacción y una muestra para efectuar una reacción enzimática. A continuación, la solución de reacción se introduce en un soporte poroso tal como un papel de filtro o una membrana fijada con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 para detectar la partícula, tal como una partícula de oro coloidal o una partícula de látex coloreada, atrapada en el soporte poroso, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13. Para introducir la solución de reacción en el soporte poroso tal como el papel de filtro o la membrana fijados con el anticuerpo monoclonal anti-N-10, se opta por utilizar el método de flujo lateral o el método de flujo paralelo por ser los más conocidos.
- 25 30 35 12. Un recipiente de reacción adecuado para detectar ópticamente ondas evanescentes se utiliza como soporte sólido por ser muy conocido. A continuación se efectúa la misma etapa descrita en el punto 4 anterior, y el anticuerpo monoclonal anti-N-10 marcado con un fluoróforo adecuado para detectar ondas evanescentes se usa para detectar dichas ondas, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13. Además, en este caso, la intensidad de las ondas evanescentes puede medirse en función del tiempo para analizar el ritmo de la actividad enzimática de la ADAMTS13. Este método no requiere el lavado y la separación de las fracciones ligada y libre (B/F) para proporcionar un análisis homogéneo.
- 40 45 13. Un anticuerpo anti-GST se inmoviliza en una partícula de oro coloidal, una partícula de látex o similar, y se hace reaccionar con el sustrato GST-VWF73, y después se le añade un tampón de reacción y una muestra para efectuar una reacción enzimática. A continuación, a la solución de reacción se le añade anticuerpo monoclonal anti-N-10 para provocar una reacción de aglutinación de las partículas. La aglutinación se puede detectar óptica o visualmente para medir la actividad de la ADAMTS13.
- 50 55 14. El sustrato GST-VWF73, un tampón de reacción y una muestra se hacen reaccionar en un recipiente tal como un tubo de ensayo para preparar una solución de reacción, a la que a continuación se le añade una partícula de oro coloidal o una partícula de látex inmovilizada con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 para que reaccione, y además se le añade un anticuerpo anti-GST, preferiblemente un anticuerpo anti-GST monoclonal para provocar una reacción de aglutinación de las partículas. La aglutinación se puede detectar óptica o visualmente para medir la actividad de la ADAMTS13.
- 60 65 15. Se hace reaccionar VWF humano o animal como sustrato con una muestra para preparar una solución de reacción, que después puede separarse mediante electroforesis en gel y hacerse reaccionar con el anticuerpo de la presente invención para medir la actividad de la ADAMTS13.
16. Un anticuerpo anti-VWF se inmoviliza en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase de anti-VWF, donde el VWF se fija previamente para preparar una fase sólida. Se hacen reaccionar una muestra y un tampón de reacción con la fase sólida, y a continuación el anticuerpo monoclonal anti-N-10 se hace reaccionar para medir la cantidad del anticuerpo antimonoclonal atrapado en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13 en la muestra.

El método para medir la actividad de la ADAMTS13 usando el anticuerpo de la presente invención puede explicarse

más específicamente con los siguientes métodos. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se usa para el anticuerpo de la presente invención y el sustrato VWF73 marcado con HRP en el extremo N tal y como se describió anteriormente se usa para un sustrato, pero la presente invención no se limita a ellos.

5 1. El sustrato VWF73 marcado con HRP, un tampón de reacción y una muestra se hacen reaccionar en un recipiente tal como un tubo de ensayo para preparar una mezcla de reacción, que entonces se hace reaccionar con anticuerpo monoclonal anti-N-10 inmovilizado previamente en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética, y se lava para medir la actividad de la HRP en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13.

10 2. El anticuerpo monoclonal anti-N-10 se inmoviliza en un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, un tubo o una partícula magnética para preparar una fase de anticuerpo monoclonal anti-N-10, a la que se añade simultáneamente sustrato VWF73 marcado con HRP, un tampón de reacción y una muestra para su reacción, y se lava para medir la actividad de la HRP en el soporte sólido, permitiendo así la medición de la actividad de la ADAMTS13.

15 Además, se pueden usar otras etiquetas distintas en lugar de la etiqueta His y la GST para realizar el método anterior utilizando sustancias que son capaces de unirse específicamente a sus etiquetas respectivas.

20 Las muestras analizables con el método de medición de la presente invención no están particularmente limitadas, y normalmente son de sangre. Este método puede medir células y tejidos, así como los productos extraídos de las células y los tejidos como muestras. Los métodos usados habitualmente en la técnica son aplicables a estas mediciones.

25 Además, los reactivos o kits pueden contener el nuevo anticuerpo de la presente invención. Los reactivos o kits de la presente invención incluyen los reactivos o kits destinados a la medición de la actividad de la ADAMTS13 en una muestra y reactivos o kits de análisis clínicos. El anticuerpo utilizado en la presente invención se refiere tanto a anticuerpos monoclonales como policlonales, y estos no están limitados siempre que logren el objetivo de la presente invención.

30 El anticuerpo de la presente invención puede aplicarse al análisis clínico que mide la actividad de la ADAMTS13, por lo que la presente invención comprende métodos de análisis de la misma. Los análisis clínicos son aplicables para examinar factores de riesgo en estados progresivos de enfermedades microangiopáticas tales como: púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), síndrome hemolítico-urémico (SHU), coagulación intravascular diseminada (CID), infarto cerebral, hepatopatía crónica, tumor maligno, VIH, infarto de miocardio, enfermedad autoinmunitaria, complicaciones del embarazo y fallo renal agudo.

35 La presente invención no solo comprende reactivos o kits para medir la actividad de la ADAMTS13 sino también los usados para los análisis descritos anteriormente. Estos reactivos o kits contienen el anticuerpo de la presente invención y también el VWF o un péptido aplicable como sustrato, si se desea. Los reactivos o kits pueden contener materiales seleccionados adecuados para analizar inmunológicamente una fracción que contiene el sustrato para la ADAMTS13 tal y como se describió anteriormente, así como el péptido N-10, el cual es un producto del sustrato hidrolizado por el anticuerpo monoclonal anti-N-10 de la presente invención, según proceda. Por ejemplo, para el método EIA, un reactivo de fase sólida tal como microplacas y partículas magnéticas inmovilizadas con un anticuerpo, un reactivo de anticuerpo marcado, un reactivo de sustrato-enzima, una solución estándar, una solución de lavado, y similares pueden combinarse adecuadamente para preparar un kit.

40 La presente invención también comprende, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-N-10 preparado mediante la utilización del péptido N-10 (un péptido que contiene un sitio al que el VWF o el VWF73 son escindidos para generar el extremo N), métodos para medir la actividad de la ADAMTS13 usando el mismo, y reactivos y kits para ello.

[Ejemplos]

Ejemplo 1

55 Producción de hibridoma y anticuerpo monoclonal anti-N-10

Método para producir hibridoma

60 (1) Ratón:

Se criaron ratones BALB/c hembra consanguíneos de entre 7 y 8 semanas de edad en una cámara de cría animal (a $23 \pm 1^\circ \text{C}$, humedad del 70%), y se les alimentó con pienso granulado estándar y acceso libre al agua.

65 (2) Antígeno de inmunización:

El péptido N-10 representado por la SEC ID n° 2 proporcionada en el listado de secuencias, sintetizado químicamente y químicamente unido a KLH, se usó como antígeno del péptido N-10.

(3) Método de inmunización:

El antígeno del péptido N-10 se preparó para tener 100 µg/0,5 ml de PBS, y se mezcló con la misma cantidad (0,5 ml) de adyuvante completo de Freund (suministrado por Difco) para preparar una emulsión. Se inyectaron por vía intraperitoneal 200 µl de este antígeno emulsionado a cuatro hembras de ratón BALB/c de 7 semanas de edad respectivamente. Además, cada dos semanas, se administró 4 veces a cada ratón 20 µg del antígeno descrito anteriormente preparado en una concentración de 100 µg/ml de GERBUVANT (GERBU Biotechnik, GmbH, D-6901 Guiberg, Alemania). Un mes más tarde, el antígeno descrito anteriormente preparado en una concentración de 100 µg/ml de GERBUVANT se administró como refuerzo del mismo modo mencionado anteriormente, y después se midieron los títulos de anticuerpos de los ratones. Dos semanas más después, el antígeno del péptido N-10 preparado en una concentración de 100 µg/ml de PBS se inyectó en la vena caudal de los ratones que presentaban un título elevado de anticuerpos como última inmunización. A continuación se efectuó la medición del título de anticuerpos según el siguiente método de cribado usando el suero de un ratón inmunizado con el antígeno de interés.

(4) Fusión de células:

Tres días después de la última inmunización se efectuó una esplenectomía a los ratones BALB/c y sus esplenocitos se suspendieron en medio de cultivo DMEM para preparar suspensiones de los mismos. A continuación, se contó el número de células para obtener $1,9 \times 10^8$ esplenocitos. Como línea celular de origen para efectuar la fusión celular se usó una línea celular de mieloma cultivada derivada de ratón BALB/c (P3-X63-Ag8-653, en adelante también denominada célula X63) que es resistente a la 2-amino-6-mercaptopurina (6-tioguanina [2-amino-6-mercaptopurina]). La célula X63 se subcultivó en medio de cultivo DMEM (con 5 µg/ml de 6-tioguanina) al que se añadió un 10% de suero fetal bovino (FCS), y se siguió cultivando en un medio de cultivo DMEM con un 10% de FCS pero sin 6-tioguanina tres días antes de la fusión celular, para usar las células en fase de crecimiento logarítmico. Se contó el número de células X63 para obtener $1,9 \times 10^5$ células vivas. Se disolvió polietilenglicol-1500 en medio de cultivo DMEM para obtener una concentración del 50% (p/v), donde los esplenocitos descritos anteriormente y las células X63 se mezclaron en una proporción 1:1 para efectuar la fusión celular según el método bien conocido (Kohler & Milstein, Nature, vol. 256, p. 495-497, 1975; Eur. J. Immunol, vol, 6, p. 511-519, 1976). A continuación, se añadió solución de selección HAT con 1×10^{-4} M de hipoxantina, 4×10^{-7} M de ametofterina y $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina al medio de cultivo DMEM provisto de un 10% de FCS y un 5% de BriClone (suministrado por Archport) para suspender los esplenocitos y obtener así $2,0 \times 10^6$ células/ml. A continuación, 100 µl de esta suspensión celular se vertieron en cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos para su cultivo en una cámara de cultivo de CO₂ libre de gérmenes con una temperatura de 37°C, humedad del 100% y CO₂ al 5%. El 3^{er} día tras el inicio del cultivo, se añadieron 100 µl de medio de cultivo HAT en cada pocillo, y después la mitad del medio de cultivo HAT se renovó cada tres días para continuar el cultivo. Entre 2 y 3 semanas más tarde, el clon deseado productor del anticuerpo monoclonal anti-ADAMTS13 se analizó mediante el siguiente método de cribado de ELISA usando microplacas adsorbidas con antígeno ADAMTS13 como fase sólida.

(5) Cribado:

La selección se efectuó haciendo reaccionar el sobrenadante de cultivo de las células de hibridoma descrito anteriormente con placas de ELISA con péptido N-10 inmovilizado y placas de ELISA con péptido N-15 inmovilizado para la selección. En este caso, se eliminaron los clones de reacción inespecífica que reaccionaron con las placas de ELISA con VWF73 y VWF purificado inmovilizados, mientras que los clones que reaccionaron específicamente con el péptido N-10 fueron seleccionados. El péptido N-10 se preparó para tener una concentración de 2 µg/ml, se añadió a cada pocillo de las placas de microtitulación en una concentración de 100 µl/pocillo, se dejó que se adhiriera durante la noche, se lavó cinco veces con un tampón de fosfato con un 0,05% de Tween-20 (al que se hace referencia en adelante como solución de lavado), a continuación se bloqueó con un tampón de fosfato con un 10% de Block Ace (marca registrada) para preparar placas con péptido N-10 inmovilizado. A las placas inmovilizadas de interés se les añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo de la línea celular de hibridoma obtenida descrita anteriormente, se hizo reaccionar a 37°C durante 60 minutos, se lavó cinco veces con solución de lavado y se siguió haciendo reaccionar a 37°C durante 60 minutos con anticuerpo de inmunoglobulina antirratón (derivado de cabra) marcado con peroxidasa de rábano (a la que se hace referencia en adelante como HRP). Después de la reacción, las placas se lavaron cuatro veces con solución de lavado y se hicieron reaccionar con una solución de sustrato (con 0,4 mg/ml de o-fenilendiamina y 0,02% de H₂O₂) a 37°C durante 15 minutos. A continuación, esta reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N antes de medir la absorbancia con un lector de placas ELISA a una longitud de onda dominante de 492 nm. Se seleccionó una línea celular de hibridoma que había reaccionado específicamente en la placa ELISA portadora del péptido N-10 inmovilizado, y se clonó mediante dilución límite para obtener el anticuerpo monoclonal anti-N-10, el Ac. del péptido del VWF N10-146 y el Ac. del péptido del VWF N10-116 respectivamente (a los que se hace referencia en adelante a veces como "N10-146" y "N10-116" respectivamente) usando hibridomas con número de registro FERM BP-10480 y FERM BP-10479.

Ejemplo 2

Confirmación de la especificidad:

- 5 Se prepararon los péptidos N-10 y N-15 para tener una concentración de 2 µg/ml, se añadieron a cada pocillo de las placas de microtitulación en una concentración de 100 µl/pocillo, se dejaron adsorber durante la noche, se lavaron cinco veces con un tampón de fosfato con un 0,05% de Tween-20 (al que se hace referencia en adelante como "solución de lavado"), y a continuación se bloquearon con un tampón de fosfato con un 10% de Block Ace (marca registrada) para preparar placas de péptido N-10 inmovilizado y placas de péptido N-15 inmovilizado. A cada placa sólida se le añadieron 100 µl de sobrenadante de cultivo de cada clon, se hicieron reaccionar a 37°C durante 60 minutos, se lavaron cinco veces con solución de lavado y se dejaron reaccionar más a 37°C durante 60 minutos con anticuerpo de inmunoglobulina antirratón (derivado de cabra) marcado con peroxidasa de rábano (en adelante abreviada como "HRP"). Después de la reacción, las placas se lavaron cuatro veces con solución de lavado, y se hicieron reaccionar con una solución de sustrato (con 0,4 mg/ml de o-fenilendiamina y 0,02% de H₂O₂) a 37° C durante 15 minutos, y después la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N antes de medir la absorbancia con un lector de placas ELISA a una longitud de onda dominante de 492 nm.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

20

(Tabla 1)

| N.º de clon | Absorbancia (492 nm) | | | |
|-------------|----------------------|--------------|------|-------|
| | Péptido N-10 | Péptido N-15 | VWF | VWF73 |
| N10-116 | 2,22 | 0,00 | 0,02 | 0,35 |
| N10-229 | 1,37 | 0,00 | 0,02 | 0,30 |
| N10-146 | 1,52 | 0,00 | 0,01 | 0,22 |

25

Las absorbancias obtenidas en el soporte sólido de péptido N-15 fueron todas de 0,00, mientras que las del soporte sólido de péptido N-10 mostraron una absorbancia de 0,5 o más (Tabla 1).

Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal de la presente invención resultó ser un anticuerpo capaz de reconocer específicamente el péptido N-10 en la proximidad del extremo C.

30

Ejemplo 3

Identificación de la subclase de inmunoglobulina de ratón:

- 35 Se determinó la subclase de inmunoglobulina de ratón del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma que se había obtenido como monoclonación mediante la clonación anterior. La subclase de inmunoglobulina de ratón se identificó mediante un kit de isotipificación de anticuerpo monoclonal de ratón suministrado por Serotec usando el sobrenadante de cultivo de cada línea celular de hibridoma. Como resultado, ambos clones de Ac. del péptido del VWF N10-116 y Ac. del péptido del VWF N10-146 demostraron ser IgG2.

40

Ejemplo 4

Confirmación de la función de anticuerpo monoclonal de ratón:

- 45 El péptido VWF73 expresado en *E. coli* por un método bien conocido se fusionó con una etiqueta GST en el extremo N y con una etiqueta de 6 residuos de histidina (etiqueta His) en el extremo C para preparar un sustrato destinado a medir la actividad de la ADAMTS13 (sustrato GST-VWF73). Previamente se hicieron reaccionar 100 µl de 1 µg/ml del sustrato con una placa de microtitulación con anticuerpo anti-GST inmovilizado (anticuerpo policlonal, derivado de cabra) para preparar un sustrato de fase sólida, al que se le añadieron 30 µl de plasma humano normal para su reacción a 37° C durante una hora. Se utilizaron 100 µl de tampón de clorhidrato Tris 5 mM (pH=8) con cloruro de bario 20 mM como solución de reacción, ya que la ADAMTS13 es una metaloenzima, por lo que necesita un metal bivalente para exhibir su actividad. Como solución de reacción para la prueba en blanco se utilizó tampón de clorhidrato Tris 5 mM con EDTA 20 mM (pH=8) en lugar de cloruro de bario 20 mM. Tras detenerse la reacción, la placa se vació de la solución de mezcla para la reacción de sustrato-enzima, se lavó y se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 (clon, Ac. del péptido del VWF N10-146, en adelante abreviado como "N10-146") a 37°C durante una hora. La placa se lavó para eliminar el anticuerpo monoclonal anti-N-10, se hizo reaccionar con anticuerpo de inmunoglobulina antirratón (cabra) marcado con peroxidasa de rábano (HRP) a 37°C durante una hora, se lavó, se hizo reaccionar con ortofenilendiamina-peróxido de hidrógeno, y se le añadió ácido sulfúrico 1M para finalizar la reacción. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm.

60

Los resultados se muestran en la tabla 2.

(Tabla 2)

| N.º de clon | Absorbancia (492 nm) | |
|---------------|----------------------|-------|
| | + Cloruro de bario | +EDTA |
| N10-116 | 0,822 | 0,20 |
| N10-229 | 0,786 | 0,20 |
| N10-146 | 0,835 | 0,05 |
| Control N15Ab | 2,58 | 2,43 |

5 En el caso del clon N15Ab usado como control, tanto la solución de reacción con cloruro de bario sometida a
 10 reacción enzimática con la ADAMTS13 como la solución de reacción con EDTA que no sufrió dicha reacción
 presentaron absorbancias prácticamente iguales, lo que indica que el péptido N-10 producido por la reacción
 enzimática con la ADAMTS13 no se pudo medir independientemente del sustrato VWF73. Al mismo tiempo, en el
 caso del anticuerpo monoclonal anti-N-10 de la presente invención (N10-146), la solución de reacción con cloruro de
 15 bario sometida a reacción enzimática con la ADAMTS13 presentó una absorbancia aproximadamente entre 14 y 63
 veces mayor que la solución de reacción con EDTA que no sufrió dicha reacción. La solución de reacción con EDTA
 presentó una absorbancia de 0,2 o menos en cualquiera de los clones (Tabla 2). Estos hechos demuestran que el
 anticuerpo monoclonal anti-N-10 de la presente invención presenta una reactividad extremadamente baja con el
 sustrato VWF73, pero presenta una especificidad extremadamente alta para reaccionar con el péptido N-10 que se
 produce cuando el sustrato es hidrolizado enzimáticamente por la ADAMTS13. Por lo tanto, resulta evidente que el
 anticuerpo monoclonal anti-N-10 de la presente invención puede ser usado para medir la actividad de la ADAMTS13.

Ejemplo 5

20 Se usaron siete tipos de péptidos (a saber, los péptidos N-10, N-6, N-8, N-11, N-9, N-13 y N-15) representados por
 las SEC ID nº 2 a 8 proporcionadas en el listado de secuencias para preparar otras tantas soluciones respectivas
 con una concentración de 1 µg/ml, 100 µl de las cuales se vertieron en otros tantos pocillos de una placa de
 microtitulación. Las placas se dejaron reposar durante la noche a una temperatura de entre 2 y 8°C, después se
 lavaron y se bloquearon para preparar una fase sólida de péptido. Cada fase sólida de péptido se hizo reaccionar
 25 con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 (N10-146) marcado con peroxidasa de rábano (HRP) para examinar la
 reactividad con dicho anticuerpo.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

(Tabla 3)

| | N-6 | N-8 | N-9 | N-10 | N-11 | N-13 | N-15 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| Método de fase sólida | 0,027 | 0,022 | 0,046 | 2,858 | 0,08 | 0,066 | 0,052 |

30 El anticuerpo monoclonal N-10 sólo mostró reactividad con el péptido N-10 y no mostró reactividad significativa con
 ningún otro péptido. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal N-10 de la presente invención resultó ser específico del
 péptido N-10, en particular de un dominio con tirosina situado en el extremo C del péptido N-10.

Ejemplo 6

40 Las soluciones de los péptidos preparadas, cada una con una concentración de 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250, 500 y
 1.000 ng/ml, se hicieron reaccionar previamente con el anticuerpo monoclonal anti-N-10 (N10-146) marcado con
 HRP y después se hicieron reaccionar con la fase del péptido N-10 para así confirmar los resultados anteriores.

Los resultados se muestran en la tabla 4.

(Tabla 4)

| Concentración de péptido añadido (ng/ml) | N-6 | N-8 | N-9 | N-10 | N-11 | N-13 | N-15 |
|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1.000 | 0,785 | 0,74 | 0,721 | 0,106 | 0,7 | 0,722 | 0,889 |
| 500 | 0,831 | 0,769 | 0,692 | 0,222 | 0,744 | 0,769 | 0,756 |
| 250 | 0,791 | 0,73 | 0,826 | 0,378 | 0,767 | 0,78 | 0,737 |
| 125 | 0,786 | 0,747 | 0,739 | 0,535 | 0,75 | 0,735 | 0,747 |
| 62,5 | 0,777 | 0,747 | 0,757 | 0,66 | 0,769 | 0,799 | 0,757 |
| 31,3 | 0,821 | 0,732 | 0,754 | 0,718 | 0,775 | 0,777 | 0,773 |
| 15,6 | 0,816 | 0,754 | 0,722 | 0,759 | 0,745 | 0,727 | 0,754 |
| 0 | 0,856 | 0,811 | 0,835 | 0,869 | 0,774 | 0,767 | 0,791 |

A excepción del péptido N-10, ninguno de los péptidos inhibió la reacción del anticuerpo monoclonal anti-N-10 con la

fase del péptido N-10. Por lo tanto, se confirmó que el anticuerpo monoclonal anti-N10 de la presente invención era específico del péptido N-10, en particular de un dominio con tirosina situado en el extremo C del péptido N-10.

Ejemplo 7

5 Cada muestra se preparó para obtener una dilución de x1, x2, x4, x8, x16, x32 y x64 con plasma humano normal que se había calentado a 56°C durante 30 minutos (plasma calentado), y el plasma calentado también se utilizó como muestra. Cada una se trató como en el ejemplo 4 para crear una curva estándar para medir la actividad de la ADAMTS13 en la que se consideró que el plasma humano normal múltiplo de 1 presentaba una actividad de la ADAMTS13 del 100%.

10 Los resultados se muestran en la figura 1. El eje X representa la actividad de la ADAMTS13 (%) y el eje Y representa la absorbancia a 492 nm. El nº 116 muestra los resultados medidos con N10-116 del anticuerpo monoclonal anti-N-10. Se confirma que la absorbancia aumenta en proporción a la actividad de la ADAMTS13, lo que demuestra que la actividad de la ADAMTS13 puede medirse con el método de la presente invención.

Ejemplo 8

20 La curva estándar de la actividad de la ADAMTS13 se realizó de la misma manera que en el ejemplo 4, pero en este caso se midió la actividad de la ADAMTS13 en plasma obtenido en un contexto de deficiencia congénita de ADAMTS13 (caso de SUS).

25 Como resultado, se calculó que el caso de SUS presentaba una actividad de la ADAMTS13 del 1% o inferior (flecha de la figura 1). Estos resultados concordaron bien con los resultados del análisis de múltiplos del VWF. Por lo tanto, se muestra que el método de la presente invención puede medir específicamente la actividad de la ADAMTS13, lo que indica que el método es útil para el examen clínico.

Ejemplo 9

30 El anticuerpo monoclonal anti-N-10 de la presente invención (N10-146) se usó para preparar una solución con una concentración de 1 µg/ml, vertiéndose 100 µl de la misma en un pocillo de una placa de microtitulación y dejándose reposar durante la noche para preparar una fase sólida de anticuerpo anti-N-10. Se colocaron 100 µl de sustrato VWF73 (1 µg/ml) y 10 µl del plasma sujeto (preparado diluyendo plasma humano normal con plasma calentado, como en el ejemplo 7) en un tubo de ensayo y se dejaron reaccionar durante una hora a una temperatura de 37°C, y a continuación se les añadió respectivamente 20 µl de EDTA 50 mM para finalizar la reacción. Se hicieron reaccionar 100 µl del reactivo con la fase sólida del anticuerpo anti-N-10 a temperatura ambiente durante una hora, se lavó, y después se hizo reaccionar durante una hora con anticuerpo anti-GST (derivado de cabra) marcado con HRP. Se midió la absorbancia generada por la reacción enzimática. Se consideró que el plasma humano normal x1 tenía una concentración de plasma sujeto (actividad de la ADAMTS13) del 100%.

40 En la figura 2 se presenta la relación entre la absorbancia obtenida y la concentración de plasma sujeto (actividad de la ADAMTS13). El eje X representa una concentración de plasma sujeto (actividad de la ADAMTS13) (%) y el eje Y representa la absorbancia a 492 nm. Estos resultados demuestran que la actividad de la ADAMTS13 puede medirse específicamente utilizando el anticuerpo de la presente invención como una fase sólida.

[Aplicabilidad industrial]

50 El anticuerpo monoclonal anti-N-10 de la presente invención se usa para permitir la medición y el análisis de la actividad de la ADAMTS13, que puede usarse como base para desarrollar agentes terapéuticos, fármacos de diagnóstico y similares.

Listado de secuencias

- <110> Japan Clinical Laboratories
- 5 <120> Anticuerpo para analizar la actividad de la ADAMTS13 y método para analizar la actividad
- <130> 535-7
- <140> EP 06712413.1
- 10 <141> 2007-08-21
- <150> 2005-036612
- <151> 2005-02-14
- 15 <150> 2005-157530
- <151> 2005-05-30
- <160> 12
- 20 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 73
- <212> PRT
- 25 <213> Artificial
- <220>
- <223> Péptido VWF escindido por la ADAMTS13
- 30 <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(73)
- <223>
- 35 <400> 1
- Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
 1 5 10 15
- Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
 20 25 30
- Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
 35 40 45
- Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
 50 55 60
- Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
 65 70
- <210> 2
- 40 <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 45 <223> Péptido del extremo N (10AA) del VWF73
- <400> 2
- Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr
 1 5 10
- <210> 3
- <211> 6

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Péptido del extremo N(6AA) del VWF73

<400> 3

Asp Arg Glu Gln Ala Pro
1 5

10 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido del extremo N (8AA) del VWF73

<400> 4

20 **Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu**
1 5

<210> 5
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido del extremo N (11AA) del VWF73

30 <400> 5

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met
1 5 10

35 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido del extremo N (9AA) del VWF73

<400> 6

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val
1 5

45 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido del extremo N (13AA) del VWF73

55 <400> 7

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr
1 5 10

60 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Péptido del extremo N (15 AA) del VWF73

5 <400> 8

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn
1 5 10 15

10 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia del péptido del extremo C N-10

<220>
<221> PÉPTIDO
20 <222> (1)..(4)
<223>
<400> 9

Asn Leu Val Tyr
1

25 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Región del extremo C del péptido que escinde el VWF

35 <400> 10

Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu
1 5 10

40 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
45 <223> Péptido C-15 que incluye el sitio de escisión ADAMTS13
<400> 11

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

50 <210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido del extremo N of c-10
<400> 12

60 Met Val Thr Gly
1

REIVINDICACIONES

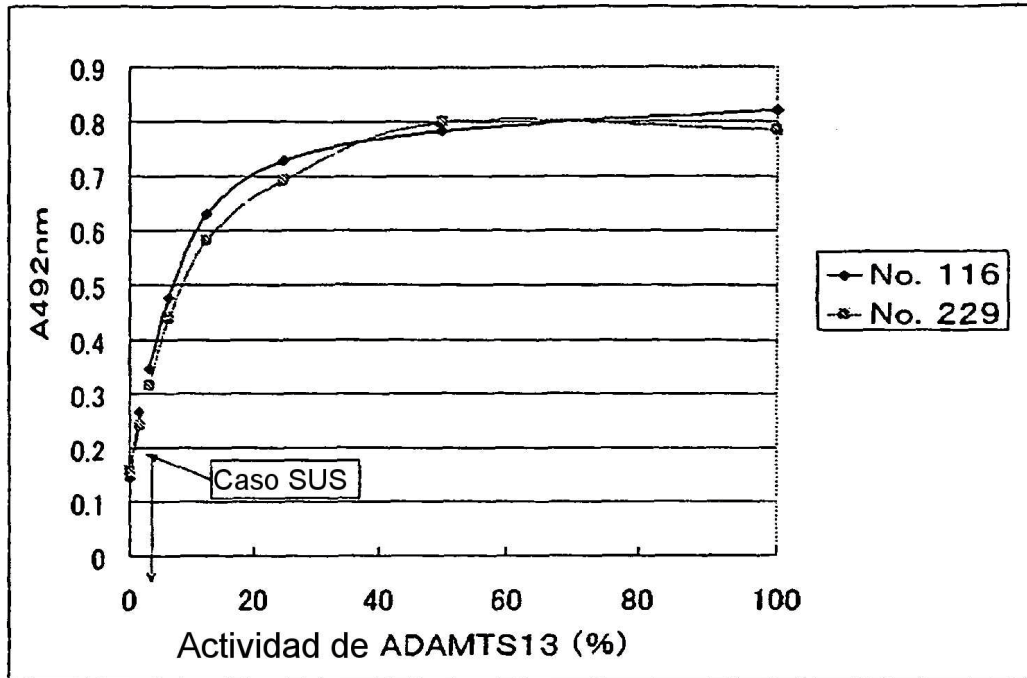
- 5 1. Anticuerpo que presenta afinidad específica por un sitio determinante antigénico producido por la reacción de la enzima de escisión del VWF ADAMTS13 con el factor de Von Willebrand (VWF) o con un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, pero que no presenta afinidad específica por el VWF o la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias, en el que el sitio determinante antigénico es un péptido que comprende en su extremo C la secuencia de aminoácidos: Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo presenta afinidad por el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias.
- 15 3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo presenta afinidad por el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionado en el listado de secuencias, pero no presenta afinidad por ninguno de los péptidos representados por las SEC ID nº 3 a 8 proporcionadas en el listado de secuencias.
- 20 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la afinidad por el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es por lo menos cinco veces más fuerte que la afinidad por el VWF purificado de plasma humano.
- 25 5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la afinidad por el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es por lo menos tres veces más fuerte que la afinidad por un péptido que presenta la secuencia representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias.
- 30 6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la afinidad por el péptido representado por la SEC ID nº 2 proporcionada en el listado de secuencias es por lo menos cinco veces más fuerte que la afinidad por el péptido representado por la SEC ID nº 8 proporcionada en el listado de secuencias.
- 35 7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 40 8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma que presenta el número de registro FERM BP-10479 o FERM BP-10480.
- 45 9. Hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 7.
- 50 10. Hibridoma según la reivindicación 9, en el que el hibridoma presenta el número de registro FERM BP-10479 o FERM BP-10480.
- 55 11. Método para medir la actividad de la ADAMTS13, que comprende las etapas que consisten en:
- hacer reaccionar
 - (i) un péptido sustrato escindible por la ADAMTS13;
 - 45 (ii) un péptido que presenta la secuencia representada por la SEC ID nº 1 proporcionada en el listado de secuencias; o
 - (iii) el VWF
 - 50 con una muestra que se va a analizar para la actividad de la ADAMTS13, y
 - hacer reaccionar el producto de reacción de la etapa anterior con por lo menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 60 12. Método para medir la actividad de la ADAMTS13 de una muestra según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo está marcado con un material de marcado.
13. Método para medir la actividad de la ADAMTS13 de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el anticuerpo es inmovilizado sobre un soporte sólido.
- 60 14. Método para medir la actividad de la ADAMTS13 en una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el anticuerpo es soportado sobre una partícula insoluble en agua.

15. Método para examinar la enfermedad microangiopática por el método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.

16. Reactivo o kit que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

5

(Figura 1)



(Figura 2)

