

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 210**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2006 E 06742825 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 1888642**

54 Título: **Asociados de enlace del factor de crecimiento placentario, en particular anticuerpos dirigidos contra el factor de crecimiento placentario, su producción y empleo**

30 Prioridad:

09.05.2005 DE 102005022047

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

03.02.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)**

**Görzhäuser Hof Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**VITZTHUM, FRANK;
TEIGELKAMP, STEFAN y
ALTHAUS, HARALD**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 441 210 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

Asociados de enlace del factor de crecimiento placentario, en particular anticuerpos dirigidos contra el factor de crecimiento placentario, su producción y empleo.

- 5 La invención se refiere a asociados de enlace del factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor* o *Placenta Growth Factor*, P/GF) en particular anticuerpos dirigidos contra el factor de crecimiento placentario, su producción y empleo.

- 10 El P/GF está involucrado de manera crucial en procesos fisiológicos patológicos, en particular en la angiogénesis. Juega un papel importante en la progresión tumoral, por afecciones renales que son provocadas en particular por diabetes Mellitus, por psoriasis, enfermedades inflamatorias, en particular artritis reumatoide, por enfermedades cardiovasculares y otras [Iyer, S.; Leonidas, D. D.; Swaminathan, G. J.; Maglione, D.; Battisti, M.; Tucci, M.; Persico, M. G.; Acharya, K. R. *J Biol Chem* 2001, 276, (15), 12153-61. / Iyer, S.; Acharya, K. R. *Trends Cardiovasc Med* 2002, 12, (3), 128-34. / Heeschen, C.; Dimmeler, S.; Fichtlscherer, S.; Hamm, C. W.; Berger, J.; Simons, M. L.; Zeiher, A. M. *JAMA* 2004, 291, (4), 435-41. / Yang, W.; Ahn, H.; Hinrichs, M.; Torry, R. J.; Torry, D. S. *J Reprod Immunol* 2003, 60, (1), 53-60.].

- 15 El P/GF se expresa de manera predominante en la placenta y pertenece a la familia de proteínas de "nudo de cisteína". P/GF está presente en diferentes formas. Son diferentes formas de P/GF (I) isoformas primarias y (II) isoformas secundarias. (III) además pueden diferenciarse entre P/GF libre (fP/GF) y P/GF enlazado (gP/GF).

(I) Isoformas P/GF primarias

- 20 Las isoformas P/GF primarias son determinadas por la secuencia primaria, es decir la sucesión de los aminoácidos en la proteína. El trenzado alternativo así como modificaciones post-translacionales, como glicosilaciones, fosforilaciones, degradación (productos de degradación, fragmentos, etc.), acetilaciones, etc., conducen a diferentes isoformas P/GF primarias. Hasta ahora se habían descrito cuatro diferentes isoformas primarias del P/GF humano, P/GF- 1 (P/GF- 131), P/GF- 2 (P/GF152), P/GF- 3 (P/GF- 203) y P/GF- 4.

La secuencia del precursor P/GF-1 (número de secuencia (SN) 1V) se lee como sigue:

- 25 SN 1 V:

1 MPVMRLFPCF LQLLAGLALP AVPPQQWALS AGNGSSEVEV VPFQEVWGRS YCRALERLVD
61 VVSEYPSEVE HMFSPSCVSL LRCTGCCGDE NLHCVPVETA NVTMQLLKIR SGRDRPSYVEL
121 TFSQHVRCEC RPLREKMKPE RCGDAVPRR

- 30 El P/GF- 1 segregado no posee por regla general la secuencia líder del precursor P/GF- 1 (precursor P/GF) y comienza con ello de manera terminal en N con alanina (A) (indicada en la secuencia del precursor P/GF- 1 como A, ver arriba). Por regla general, esto aplica también para las otras isoformas primarias de P/GF.

La frecuencia de la isoforma primaria de P/GF-1 se lee con ello como sigue:

SN 1:

- 35 1 ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM
121 KPERCGDAVP RR

- 40 Esta secuencia primaria permite reconocer posiciones posibles para modificaciones post-translacionales y con ello también la ocurrencia de isoformas primarias modificadas de modo post-translacional. Por ejemplo, en general está presente in vivo la isoforma P/GF primaria modificada por vía translacional del P/GF-1 glicosilado en la posición 84 (asparagina, N).

Como primer aminoácido terminal en N de la isoforma primaria de P/GF- 1 se indica frecuentemente en lugar de alanina la metionina (M). Esto se refiere en general a P/GF- 1 recombinante (rP/GF- 1) expresado por ejemplo en *Escherichia coli* (*E. coli*), en particular en el rP/GF- 1 humano (rhP/GF- 1). Aquí se emplea como codón de inicio

ES 2 441 210 T3

AUG, el cual codifica para metionina. Tal P/GF expresado en E. coli no posee modificaciones post-translacionales, en particular tampoco glicosilaciones.

La secuencia de la isoforma P/GF-1 primaria humana recombinante es indicada en general de la siguiente forma:

SN 1RH:

5 1 MLPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM
121 KPERCGDAVP RR

Mediante el trenzado alternante, en la isoforma P/GF-2 en lugar de la arginina (R) 124 se encuentra la secuencia RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL. De allí que la secuencia de la isoforma P/GF-2 primaria se lee:

10 SN 2:

1 ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM
121 KPERRRPKGR GKRRREKQRP TDCHLCGDAV PRR

15 Una inserción de 72 aminoácidos incluida mediante trenzado alternante (HSPGRQSPDMPGDFRADAPS FLPPRRSLPMLFRMEWGCALTGSQSAVWPSSPVPEEI PRMHPGRNGKKQQRK) conduce a la secuencia de isoforma primaria de P/GF-3:

SN 3:

1 ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRHSPGRQ
20 121 SPDMPGDFRA DAPSFLPPRR SLPMLFRMEW GCALTGSQSA VWPSSPVPEE IPRMHPGRNG
181 KKQQRKPLRE KMKPERCGDA VPRR

La isoforma primaria P/GF-4 incluye tanto secuencias de la isoforma P/GF-2 (cursiva) como también de la isoforma P/GF-3 (subrayada):

SN 4:

25 1 ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRHSPGRQ
121 SPDMPGDFRA DAPSFLPPRR SLPMLFRMEW GCALTGSQSA VWPSSPVPEE IPRMHPGRNG
181 KKQQRKPLRE KMKPERRRPK *GRGKRRREKQ RPTDCHLCGD* AVPRR

(II) Isoformas secundarias P/GF

30 Las isoformas P/GF secundarias surgen de la combinación de isoformas P/GF primarias u otras moléculas, en particular moléculas que son homólogas a P/GF. Las isoformas P/GF primarias o bien otras moléculas representan subunidades de las isoformas P/GF secundarias. En general las isoformas P/GF secundarias consisten en dos subunidades. Con ello por regla general P/GF está presente como dímero, es decir como homodímero o heterodímero. Los homodímeros consisten en dos isoformas P/GF primarias iguales (subunidades) como P/GF-1 x P/GF-1, P/GF-2 x P/GF-2, P/GF-3 x P/GF-3 y P/GF-4 x P/GF-4. Los heterodímeros consisten en dos isoformas primarias P/GF diferentes o una isoforma P/GF primaria y otra molécula, en particular homólogos de P/GF como el

35

factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus isoformas primarias. Son ejemplos posibles de heterodímeros P/GF-1 x P/GF-2, P/GF-3 x P/GF-4, P/GF-1 x VEGF, etc.

(III) P/GF (fP/GF) libre y P/GF (gP/GF) enlazado

5 Puesto que P/GF forma complejos con asociados de enlace, aparte de las isoformas son de considerar también las formas de P/GF que forman complejos o bien que están enlazadas. En principio son de diferenciar las isoformas P/GF primarias libres, sin embargo en particular las isoformas P/GF secundarias libres (P/GF, fP/GF libres) de las formas que forman complejos o bien que están enlazadas (P/GF, gP/GF enlazados). El gP/GF es por ejemplo homodímero P/GF- 1, que está presente en forma de complejo. Para esto puede ser un complejo simple, es decir un homodímero P/GF- 1 está unido a un receptor, por ejemplo al receptor 1 de tirosinquinasa (mFlt- 1) unido a la membrana similar a fms. Otros ejemplos son complejos con la Flt- 1 soluble (sFlt- 1), con neurofilinas (NP; en particular NP- 1 y NP- 2), con el receptor que contiene el dominio de quinasa/receptor de quinasa de hígado fetal (KDR/Flk- 1, VEGFR- 2), con heparinsulfatoproteoglicanos (HSPG) así como sus isoformas, homólogos, fragmentos y productos de degradación. Así mismo son imaginables complejos compuestos multifacéticos de varias y dado el caso en diferentes isoformas P/GF y varios y dado el caso diferentes asociados de enlace, en particular receptores.

15 La función de P/GF es promovida, modulada o bien inhibida mediante el enlace al receptor 1 de tirosinquinasa (mFlt-1) unido a la membrana o bien soluble similar a fms (receptor de tirosinquinasa similar a 1 fms (Flt- 1) o receptor 1 de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF (VEGFR- 1)) así como el "receptor que contiene el dominio de quinasa/receptor de quinasa de hígado fetal ((KDR/Flk- 1 o bien VEGFR- 2). Aparte de otras posibles funciones de P/GF es relevante en particular el enlace de P/GF a Flt- 1 (mFlt- 1) unido a la membrana. Esto conduce a la transfosforilación de mFlt-1 y activa con ello las cascadas de transducción de señal [Iyer, S.; Acharya, K. R. Trends Cardiovasc Med 2002, 12, (3), 128- 34].

25 En contraste con esto se da por sentado que la unión de P/GF a sFlt-1 sirve para reducir la actividad fisiológica de P/GF [Iyer, S.; Acharya, K. R. Trends Cardiovasc Med 2002, 12, (3), 128-34.]. Además, se da por sentado que la isoforma P/GF juega un papel. P/GF -2, el cual tal vez está asociado con la membrana, posee una inserción catiónica de 21 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. Mediante el enlace de sustancias aniónicas, en particular polianiónicas, como heparina, heparinsulfatoproteoglicanos, etc., pueden promoverse otras funciones. La N-glicosilación de asparagina (Asn) 84 así como la secuencia de aminoácidos que se encuentra en el P/GF-3 pueden tener también consecuencias correspondientes. Además, se da por sentado que la unión de P/GF y VEGF tiene a su turno otra consecuencia, puesto que aquí se regula de manera negativa la expresión de VEGF y con ello su actividad [Iyer, S.; Acharya, K. R. Trends Cardiovasc Med 2002, 12, (3), 128-34.]. En resumen, eso significa que las diferentes formas de P/GF tienen diferentes funciones o bien actúan de modo diferente.

Estado de la técnica

35 Para los métodos actuales de detección así como para los asociados de unión, en particular anticuerpos, que son empleados en el momento para propósitos analíticos y de diagnóstico existe el problema de que las diferentes formas de

P/GF no se diferencian o no lo hacen de manera suficientemente eficiente (no suficientemente específica). Por ejemplo el "anticuerpo P/GF antihumano " de R&D Systems, Inc. no detecta exclusivamente formas determinadas de P/GF, en particular homodímeros de rhP/GF-1 sino también el heterodímero de rhP/GF y VEGF así como rhP/GF-2 (R&D Systems número de catálogo: AF-264-PB o bien descripciones de producto DPG00).

40 Además no se detecta exclusivamente fP/GF o gP/GF, es decir con los anticuerpos integrantes no se diferencia entre fP/GF y gP/GF o no se hace de manera suficientemente eficiente. En particular, la expresión específica de fP/GF es insuficiente. Esto muestra que rhFlt-1 en forma de rhFlt-1/Fc tiene una influencia en la determinación de P/GF (R&D Systems número de catálogo: DPG00). En la literatura se reconoce esta falta de especificidad [Maynard, S. E.; Min, J. Y.; Merchan, J.; Lim, K. H.; Li, J.; Mondal, S.; Libermann, T. A.; Morgan, J. P.; Sellke, F. W.; Stillman, I. E.; Epstein, F. H.; Sukhatme, V. P.; Karumanchi, S. A. J Clin Invest 2003, 111, (5), 649-58.]. Maynard et al. muestra que el correspondiente sistema R&D ELISA (R&D Systems número de catálogo: AF-264-PB o bien DPG00) en verdad deja reconocer una cierta especificidad para fP/GF, que las investigaciones ejecutadas muestran sin embargo que esta especificidad es la baja. En la determinación de 0,5 ng/mL de rhP/GF-1 se registra en presencia de 0,5 ng/mL de sFlt-1 una reducción de señal de sólo aproximadamente 12 %. En sí mismo con un exceso de 10 veces de sFlt-1 (5 ng/mL) ocurre solamente una reducción de señal de un factor de 2. Había ocurrido una clara reducción de señal con una elevada especificidad de los anticuerpos empleados frente a fP/GF.

Objetivo y su solución acorde con la invención

Por consiguiente, la presente invención basó su objetivo en suministrar métodos o bien componentes que hicieran posible la confirmación específica de determinadas formas de P/GF, en particular con ayuda de asociados de unión específicos en forma de anticuerpos.

5 La solución de este objetivo consiste en el suministro de los materiales y métodos acordes con la invención descritos en las reivindicaciones.

10 En particular se logra el objetivo mediante el suministro de anticuerpos, que se ligan de manera específica a las isoformas primarias del P/GF. Estos anticuerpos forman la base de la comprobación inmunológica y la cuantificación de las isoformas primarias y secundarias así como de las formas libres o bien enlazadas de P/GF. Esto aplica en particular para materiales biológicos, en particular muestras de plasma, para aplicaciones diagnósticas. Asimismo, son imaginables aplicaciones terapéuticas.

De modo sorprendente, pueden confirmarse las diferentes formas de P/GF como se describe a continuación. A continuación se aclara en detalle la elección de los asociados de unión y de las sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la confirmación específica del P/GFs libre:

15 En principio son adecuados los asociados específicos de unión, en particular anticuerpos y proteínas de la familia de las receptoras de tirosinas, en particular Flt-1, Flt-2, Flt-3, Flt-4, preferiblemente Flt-1, homólogos, fragmentos y productos de degradación que se unen en el ámbito del dominio que enlaza al receptor en los polos de la isoforma secundaria de P/GF, en particular para la confirmación del fP/GF, en particular el P/GF no unido a m/sFlt-1.

20 En particular son adecuados los asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, que son producidos empleando isoformas primarias y secundarias P/GF libres, en particular isoformas P/GF secundarias, preferiblemente homodímeros de P/GF, de modo particularmente preferido homodímeros P/GF- 1, en particular homodímeros rhP/GF- 1, preferiblemente homodímeros N glicosilados rhP/GF- 1, por ejemplo mediante inmunizaciones, y que en la caracterización muestran que con la unión ocurren, o bien son necesarias, interacciones en el ámbito de las posiciones de unión del receptor.

25 La orientación "cabeza-cola" de los monómeros (isoformas primarias de P/GF) en dímeros (isoformas secundarias de P/GF) conducen con ello a que el dominio que enlaza al receptor se encuentra en cada caso en los polos de los dímeros P/GF. La unión del receptor tiene lugar en la frontera monómero-monómero y no exclusivamente en un monómero.

30 En particular péptidos, que poseen sólo la información de secuencia de un monómero y con ello no incluyen la totalidad del dominio que se une al receptor, el cual está constituido de ambos monómeros, son sorprendentemente adecuados de manera particular como antígenos de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de fP/GF.

35 Los péptidos, que contienen aminoácidos que son relevantes para interacciones de receptor o péptidos, que cubren el ámbito de secuencia en su cercanía, son particularmente adecuados como antígenos de inmunización. Los aminoácidos que no son en particular relevantes exclusivamente para interacciones de receptor Flt- 1, son representados subrayados a continuación dentro de la secuencia P/GF-1. La secuencia P/GF- 1 fue elegida como ejemplo para la representación. Estos aminoácidos son relevantes también en otras isoformas P/GF para interacciones de receptor.

SN 1:

1 ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEW GRSYCRALER LVDVSEYPS EVEHMFSPSC

40 61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM

121 KPERCGDAVP RR

E-112 y P-115 forman una excepción, en particular sin embargo P-115, que presumiblemente tiene un papel secundario o no juega ningún papel para P/GF-3 y P/GF-4 en las correspondientes interacciones de receptor, puesto que entre estos aminoácidos está la inserción de 72 aminoácidos descrita arriba (SN 3 y SN 4).

45 Los siguientes péptidos son particularmente adecuados como antígeno de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de fP/GF (números de antígeno de inmunización (IAN) 1-4):

IAN 1: SAGNGSSEVE VVPFQEWGR SYCRALERLV

IAN 2: LRCTGCCGDE NLHCVPVET

IAN 3: VETANVTMQL LKIRSGDRP SYVELTFSQH

IAN 4: TFSQHVRCEC RPLREKMKPE RCGDAVPRR.

5 Los antígenos de inmunización pueden contener también secuencias de diferentes péptidos con los números de antígeno de inmunización IAN 1-4. Por ejemplo pueden emplearse los siguientes péptidos:

IAN 2/3: VPVETANVTM QL.

A continuación se aclaran en detalle formas específicas de operación:

10 Un objetivo de esta invención son los péptidos que consisten en una de las secuencias de aminoácidos IAN 1 o IAN 3 o en una parte de estos péptidos, donde la parte contiene por lo menos una de las secuencias de aminoácidos VVPFQEVWGRSY (IAN: 1-1-2) o RSGDRPSYVELT (IAN: 3-3-1).

15 También se manifiestan péptidos, que contienen 5 aminoácidos consecutivos de la secuencia indicada, es decir por ejemplo EVVPF (IAN: 1-2), VVPFQ (IAN:1-3), VPFQE (IAN: 1-4), PFQEV (IAN: 1-5), FQEVW (IAN: 1-6), QEVWG (IAN: 1-7), EVWGR (IAN: 1-8), VWGRS (IAN: 1-9), WGRSY (IAN: 1-10), GRSYC (IAN: 1-11), RSYCR (IAN: 1-12), SYCRA (IAN: 1-13), YCRAL (IAN: 1-14) o GCCGD (IAN: 2-2), CCGDE (IAN: 2-3), CGDEN (IAN: 2-4), etc. a hin zu PLREK (IAN: 4-2),.

20 Para la inmunización pueden emplearse antígenos de inmunización no enlazados y/o enlazados al soporte. Para facilitar el acoplamiento soportes típicos como por ejemplo proteínas, como ovoalbúmina, albúmina o hemocianina de lapa de Keyhole, se sintetizan preferiblemente péptidos que contienen una lisina. Para esto son adecuados en particular los siguientes péptidos: SAGNGSSEVEVVK (IAN: 1-1-1K), RSGDRPSYVELTK (IAN: 3-3-1K), VPVETANVTMQLK (IAN: 2/3K), VVPFQEVWGRSYK (IAN: 1-1-2K), GCCGDENLHK (IAN: 2-1-1K).

Así mismo, como antígenos de inmunización pueden emplearse "sistemas múltiples de péptidos antigénicos" [Tam, J.P. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85, 5409-5413]. En particular pueden emplearse octámeros de IAN 1-1-1, IAN 3-3-1 o IAN 2/3:

IAN 1- 1- 1\8-mero: (SAGNGSSEVEVV)₈K₄K₂K- βA

25 IAN 3- 3- 1\8-mero: (RSGDRPSYVELT)₈K₄K₂K- βA

IAN 2/3\8-mero: (VPVETANVTMQL)₈K₄K₂K- βA

A continuación se aclara en detalle la elección de sustancias para la producción de asociados específicos de unión, para la comprobación específica de gP/GF:

30 En el empleo de gP/GF se determinan o bien se producen anticuerpos específicos, por ejemplo mediante inmunizaciones. Estos asociados específicos de unión se distinguen en su caracterización porque en la unión ocurren tanto interacciones con el P/GF como también con el asociado de unión enlazado.

35 Por ejemplo, para la producción de anticuerpos en la inmunización pueden emplearse P/GF que forma un complejo con un asociado de unión. Para esto pueden ser en particular homodímeros P/GF-1, que están formando complejo con sFlt-1. De modo correspondiente pueden emplearse así mismo complejos que consisten en los respectivos homólogos, fragmentos, etc.

A continuación se ilustra en detalle la elección de las sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de P/GF modificados por vía translacional, en particular glicosilados.

40 Para esto se emplea P/GF o los correspondientes péptidos con o bien sin modificación post-translacional para la producción de asociados específicos de unión, en particular anticuerpos. Los asociados específicos de unión son entonces adecuados específicamente para confirmar la ausencia o bien la presencia de modificaciones de post-translacionales.

Por ejemplo puede emplearse péptidos N-glicosilados que contienen la secuencia VETANVTMQ (IAN: 3-4) o partes de ella, por ejemplo VETAN (IAN: 3-5), TANVT (IAN: 3-6), NVTMQ (IAN: 3-7), para la producción de asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, que pueden ser empleados de manera específica para la detección

ES 2 441 210 T3

de P/GF glicosilado en asparagina 84 (N 84). Aparte de estos péptidos N-glicosilados, asimismo es imaginable el empleo de P/GF glicosilado, o bien de los fragmentos correspondientes.

5 Además, mediante el empleo de los correspondientes péptidos homólogos, no glicosilados, pueden producirse P/GF y los correspondientes fragmentos de asociados de unión, los cuales pueden ser empleados en la detección específica de P/GF no glicosilado.

A continuación se explica en detalle la elección de sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de P/GF-2:

10 Para esto, para la producción de asociados específicos de unión se emplean isoformas primarias o secundarias de P/GF- 2, fragmentos de ellas o los correspondientes péptidos, en particular anticuerpos. En particular son especialmente adecuados péptidos y sus fragmentos, como antígenos de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de de P/GF- 2, los cuales contienen la siguiente secuencia o partes de ella:

IAN 5: REKMKPERR RPKGRGKRRR EKQRPTDCHL CGDAVPR.

Se prefiere de modo particular emplear péptidos que contienen la secuencia subrayada o partes de ella.

15 En particular son especialmente adecuados péptidos, que contienen 5 aminoácidos consecutivos de la secuencia indicada arriba (IAN 5), por ejemplo MKPER (IAN: 5-1), KPERR (IAN: 5-2), etc. hasta LCGDA (IAN: 5-3).

20 Aparte de los asociados específicos de unión para P/GF-2, en particular anticuerpos que son generados por la inmunización u otros procedimientos con las proteínas y péptidos arriba descritos, es posible así mismo emplear asociados específicos de unión como compuestos aniónicos, en particular compuestos polianiónicos, preferiblemente compuestos de heparina, en particular heparinsulfatoproteoglicanos. En otra forma de operar, como asociados específicos de unión P/GF-2 se emplean proteínas que se cuentan entre las familias de los receptores de semaforina, en particular neuropilinas, preferiblemente neuropilina-1 (NP-1) y neuropilina 2 (NP-2).

A continuación se explica en detalle la elección de sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de P/GF-3:

25 Para esto, para la producción de asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, se emplean isoformas primarias o secundarias de P/GF- 2, fragmentos de ellas o los correspondientes péptidos. En particular, como antígenos de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de P/GF- 3, son especialmente adecuados péptidos y sus fragmentos que contienen la siguiente secuencia o partes de ella:

IAN 6:

1 HVRCECRHSP GRQSPDMPGD FRADAPSFLP PRRSLPMLFR MEWGCALTGS

30 51 QSAVWPSSPV PEEIPRMHPGR NGKKQQRKP LREKMK.

En particular se prefiere emplear péptidos que contienen la secuencia subrayada o partes de ella.

En particular son especialmente adecuados péptidos, que contienen 5 aminoácidos consecutivos de la secuencia indicada IAN 6, es decir por ejemplo CECRH (IAN: 6-1), ECRHS (IAN: 6-2) etc. hasta KPLRE (IAN: 6-3).

35 A continuación se explica en detalle la elección de asociados de unión y la de sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de P/GF-4:

Para esto, para la producción de asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, se emplean isoformas primarias o secundarias de P/GF- 4, fragmentos de ellas o los correspondientes péptidos. En especial, como antígenos de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de P/GF- 4, son particularmente adecuados péptidos y sus fragmentos, que contienen la siguiente secuencia o partes de ella:

40 En particular se prefiere emplear péptidos, que contienen los aminoácidos subrayados.

IAN 7: NGKKQQRKPL REKMKPERRR PKGRG.

En particular son adecuados péptidos que contienen las siguientes secuencias: QQRKP (IAN: 7-1), QRKPL (IAN: 7-2), RKPLR (IAN: 7-3), KPLRE (IAN: 6-3), MKPER (IAN: 5-1), KPERR (IAN: 5-2), PERRR (IAN: 7-4), ERRRP (IAN: 7-5).

- 5 Puesto que P/GF- 4 contiene tanto secuencias específicas de PIGF- 2 como también secuencias específicas de P/GF-3, puede ejecutarse la detección de P/GF- 4 con ayuda de asociados específicos de unión P/GF- 2 y asociados de unión P/GF-3 acordes con la invención, en particular anticuerpos, que son producidos mediante antígenos acordes con la invención, en particular péptidos.

A continuación se explica la elección de asociados de unión y la de sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de heterodímeros de P/GF/VEGF:

- 10 Puesto que los heterodímeros de P/GF/ VEGF contienen tanto secuencias específicas de P/GF (P/GF 1- 4) como también secuencias específicas de VEGF (isoformas VEGF), puede ejecutarse la detección de heterodímeros de P/GF/ VEGF, con ayuda de anticuerpos específicos acordes con la invención que son producidos mediante antígenos, en particular péptidos, y anticuerpos de VEGF.

- 15 En particular pueden emplearse también anticuerpos específicos, que habían sido determinados o bien producidos empleando heterodímeros de VEGF/P/GF, por ejemplo mediante inmunizaciones, y que en la caracterización muestran que en la unión ocurren tanto interacciones con los monómeros VEGF como también con los monómeros PIGF.

- 20 Un método preferido para la producción de péptidos acordes con la invención, que es empleado entre otros como antígeno de inmunización, es la síntesis en fase sólida, donde se sintetizan números múltiples de copias de un péptido en un núcleo de lisina [s. a. Tam J. P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5409-5413]. La síntesis de péptidos es ejecutada según un protocolo estándar, preferiblemente con ayuda de robots como se suministran por ejemplo por Applied Biosystems (USA). Tales péptidos multiméricos pueden estar unidos además a una proteína de soporte.

- 25 Se entiende por "asociado específico de unión" un socio de un par específico de unión. Los socios de un par específico de unión son dos moléculas que en cada caso exhiben por lo menos una estructura complementaria a una estructura de otra molécula, donde las dos moléculas tienen la capacidad de unirse mediante un enlace a las estructuras complementarias. El concepto de molécula incluye también complejos de moléculas como por ejemplo enzimas que consisten en apo- y coenzimas, proteínas que consisten en varias subunidades, lipoproteínas que consisten en proteína y lípidos, etc. Los asociados específicos de unión pueden proceder de fuentes naturales pero también por ejemplo ser sustancias producidas por medio de síntesis química, técnicas microbiológicas y/o métodos de tecnología genética. La siguiente enumeración sigue para aclarar el concepto de asociados específicos de unión, sin que sin embargo esto lo limite a estas sustancias: globulinas que se enlazan a tiroxina, proteínas que se enlazan a esteroides, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de diseño repetido, andamios de proteína, anquirinas, repeticiones ricas en leucina, anticalinas, duocalinas, lipocalinas, Affibodies®, antígeno, haptenos, enzimas, lectinas, ácidos nucleicos, en particular aptámeros, represores, oligo- y polinucleótidos, proteína A, proteína G, avidina, estreptavidina, biotina, componentes complementarios Clq, proteínas que se enlazan a ácidos nucleicos, etc. Son por ejemplo pares específicos de unión: anticuerpo-antígeno, anticuerpo-hapteno, operador - represor, nucleasa-nucleótido, biotina-avidina, lectina- polisacárido, proteína que se enlaza a esteroide, principio activo-receptor de principio activo, hormona-receptor de hormona, enzima sustrato, proteína A IgG, oligo-
40 polinucleótidos complementarios, etc.

En el sentido de esta invención el concepto "péptidos" incluye amidas que por hidrólisis se descomponen en aminoácidos, por ejemplo aminoácidos poliméricos como por ejemplo polipéptidos, oligopéptidos, proteínas o fragmentos de proteína.

- 45 Los péptidos acordes con la invención pueden ser empleados como antígenos de inmunización para la producción de los anticuerpos acordes con la invención o también para la purificación por cromatografía de afinidad de los anticuerpos acordes con la invención. Además los péptidos acordes con la invención pueden ser empleados también en un método para la detección cualitativa cuantitativa de un analito, preferiblemente de las diferentes formas de P/GF. Los péptidos acordes con la invención pueden estar también asociados con una fase sólida y/o un componente de un sistema que forma señal, por ejemplo en un inmuno-ensayo.

- 50 El concepto "antígeno" incluye antígenos monovalentes y polivalentes. Un antígeno polivalente es una molécula o un complejo de moléculas, a el/las cual(es) puede(n) ligarse simultáneamente más de una inmunoglobulina, mientras que en un antígeno monovalente puede ligarse al mismo tiempo en cada caso sólo un anticuerpo individual. Como hapteno se denomina comúnmente una molécula IAN 7: NGKKQQRKPL REKMKPERRR PKGRG, que por sí sola no es inmunogénica, sino que para propósitos de inmunización comúnmente está unida a un soporte.

En el sentido de esta invención, se entiende bajo el concepto "anticuerpos" una inmunoglobulina, por ejemplo una inmunoglobulina de la categoría o bien subcategoría IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgM. Un anticuerpo exhibe por lo menos una posición de enlace (denominado frecuentemente como parátipe) para un epítipo (denominado frecuentemente también determinante antigénico) sobre un antígeno o hapteno. Tal epítipo está
 5 caracterizado por ejemplo por su estructura espacial y/o por la presencia de grupos polares y/o apolares. La posición de unión del anticuerpo es complementaria al epítipo. La reacción antígeno-anticuerpo o bien la reacción hapteno-anticuerpo funciona según el denominado "principio de llave-cerradura " y por regla general es específica en un elevado grado, es decir los anticuerpos permiten diferenciar pequeñas desviaciones en la estructura primaria, en la carga, en la configuración espacial y el ordenamiento estérico del antígeno o hapteno. En particular las denominadas
 10 "regiones determinantes de complementariedad" del anticuerpo contribuyen a la unión del anticuerpo al antígeno o hapteno.

En el sentido de esta invención bajo el concepto "anticuerpos" se entiende no sólo anticuerpos completos sino expresamente también fragmentos de anticuerpos, como por ejemplo Fab, Fv, F(ab')₂, Fab'; así como también anticuerpos quiméricos, humanizados, bio-oligospecíficos, o "de cadena simple"; además también agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas y/o sus fragmentos, en tanto se preserven las propiedades de enlace al antígeno o hapteno. Se producen fragmentos de anticuerpos por ejemplo mediante escisión enzimática de anticuerpos con enzimas como pepsina o papaina. Pueden generarse agregados, polímeros y conjugados de anticuerpos mediante diversos métodos, por ejemplo mediante tratamiento con calor, transformación con sustancias como glutaraldehído, reacción con moléculas que se unen a inmunoglobulina, biotilación de anticuerpos y
 15 subsiguiente reacción con estreptavidina o avidina, etc.

En el sentido de esta invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o uno policlonal. Los anticuerpos pueden haber sido producidos según métodos comunes, por ejemplo mediante inmunización de humanos o de un animal, como por ejemplo ratón, tatas, cobayos, conejos, caballo, asno, oveja, cabra, pollo [Messerschmid (1996) BIOforum 11: 500-502], y subsiguiente obtención del antisuero; o mediante el establecimiento de células de hibridoma y la subsiguiente purificación de los anticuerpos secretados; o mediante clonación y expresión de las secuencias de nucleótidos o bien versiones modificadas de ellas, las cuales codifican las secuencias de aminoácidos que son responsables por la unión de los anticuerpos naturales al antígeno y/o hapteno.
 25

Son anticuerpos acordes con la invención en particular aquellos anticuerpos, que se unen sobre las proteínas, complejos de proteínas o bien péptidos arriba descritos.

Mediante el suministro de los anticuerpos acordes con la invención es posible ahora para el experto, por ejemplo mediante experimentos de competencia [Peters et al. (1985) Monoklonales Antikörper, editorial Springer, capítulo 12.2 "Epitop-Analyse"], identificar otros anticuerpos específicos que se unen al epítipo de un anticuerpo acorde con la invención. De este modo se seleccionan ahora asociados específicos de unión con ayuda de bibliotecas de despliegue de fagos, sobre bancos de datos de péptido sintético por medio de "bibliotecas de anticuerpos recombinantes" [Larrick & Fry (1991) Human Antibodies and Hybridomas 2: 172- 189].
 30
 35

También es objetivo de esta invención un anticuerpo acorde con la invención, el cual está asociado con una fase sólida y/o un componente de un sistema que forma señal.

En el sentido de esta invención, el concepto "fase sólida" incluye un objeto que consiste en material poroso y/o no poroso, por regla general insoluble en agua y que puede exhibir las más variadas formas, como por ejemplo las de recipientes, tubillos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, palillos, tiras, papel de filtro o de cromatografía, etc. Por regla general, la superficie de la fase sólida es hidrófila o puede ser convertida en hidrófila. La fase sólida puede consistir en diferentes materiales, como por ejemplo en materiales inorgánicos y/o en materiales orgánicos, materiales sintéticos, de ocurrencia natural y/o materiales de ocurrencia natural modificados. Son ejemplos de materiales de fase sólida los polímeros como por ejemplo celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, poliacrilamida, moléculas entrelazadas de dextrano, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nylon; cerámica, vidrio, metales, en particular metales nobles como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de los mismos; etc. El concepto de fase sólida incluye también células, liposomas o vesículas de fosfolípidos.
 40
 45

La fase sólida puede exhibir una cobertura de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, carbohidratos, sustancias lipófilas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de ellos, por ejemplo para impedir o suprimir la unión no específica de componentes de las muestras a la fase sólida o por ejemplo para alcanzar mejoramientos respecto a la estabilidad de la suspensión de fases sólidas en forma de partículas, la estabilidad al almacenamiento, la estabilidad a la conformación o la resistencia frente a la luz UV, microbios u otros agentes con efecto de descomposición.
 50

Frecuentemente se usan micropartículas como fase sólida y/o como etiquetas. En el sentido de esta invención bajo el concepto "micropartícula" se entiende la que exhibe un diámetro aproximado de por lo menos 20 nm y no mayor a
 55

20 μm , comúnmente entre 40 nm y 10 μm , preferiblemente entre 0, 1 y 10 μm , particularmente preferido entre 0, 1 y 5 μm , de modo muy particularmente preferido entre 0, 15 y 2 μm . Las micropartículas pueden tener forma regular o irregular. Ellas pueden representar esferas, esferoides, esferas con más o menos cavidades grandes o poros. Las micropartículas pueden consistir de materiales orgánicos, materiales inorgánicos o de una mezcla o combinación de
 5 ambos. Ellas pueden consistir de un material poroso o no poroso, un material que puede hincharse o que no puede hincharse. En principio las micropartículas pueden tener cualquier densidad, sin embargo se prefieren partículas con una densidad, que está cerca de la densidad del agua como aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,5 g/ml. Las micropartículas preferidas pueden estar suspendidas en soluciones acuosas y tener una estabilidad en suspensión tan larga como sea posible. Ellas son preferiblemente transparentes, parcialmente transparentes o no transparentes.
 10 Las micropartículas pueden consistir de varias capas como por ejemplo las partículas denominadas " núcleo- y- concha" con un núcleo y una o varias capas envolventes. El concepto de micropartícula incluye por ejemplo cristales de colorantes, soles metálicos, partículas de sílice, partículas de vidrio, partículas magnéticas, partículas de polímeros, gotas de aceite, particular de lípidos, dextran y agregados de proteína. Las micropartículas preferidas pueden ser suspendidas en soluciones acuosas y pueden ser de partículas que consisten en materiales poliméricos insolubles en agua, en particular de polietilenos sustituidos. De modo muy particular se prefieren partículas de látex,
 15 por ejemplo de poliestireno, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ácido metacrílico, polímeros de acrilonitrilo, acrilonitrilo- butadieno- estireno, acetato de polivinilo-acrilato, polivinilpiridina, cloruro de vinilo-acrilato. Son de particular interés las partículas de látex con grupos reactivos en su superficie como por ejemplo grupos carboxilo, amino o aldehído, que permiten un enlace covalente por ejemplo de asociados específicos de unión a la partícula de látex. Por ejemplo, en EP 0 080 614, EP 0 227 054 y EP 0 246 446 se describe la producción de partículas de látex.

Un "sistema que forma señal " puede ser un sistema de uno o varios componentes, donde por lo menos un componente es una etiqueta que puede ser detectada. Como etiqueta se entiende toda molécula que por sí misma puede producir una señal o puede inducir la producción de una señal, como por ejemplo una sustancia fluorescente, una sustancia radioactiva, una enzima o una sustancia quimioluminiscente. La señal puede ser detectada o medida
 25 por ejemplo mediante actividad enzimática, la luminiscencia, la absorción de luz, la difracción de luz, la radiación electromagnética o radioactiva emitida o una reacción química.

Una etiqueta permitió por sí misma generar una señal detectable, de modo que no se requieren otros componentes. Muchas moléculas orgánicas absorben luz ultravioleta y visible, mediante lo cual estas moléculas pueden entrar en un estado energético excitado y liberar la energía absorbida en forma de luz de otra longitud de onda diferente a la
 30 de la luz incidente. De nuevo, otras etiquetas pueden generar de manera directa una señal que puede ser detectada, como por ejemplo isótopos radioactivos o colorantes.

Para la generación de señal, otras etiquetas requieren otros componentes, es decir el sistema productor de señal bloquea en tal caso todos los componentes requeridos para la formación de señal con por ejemplo un sustrato, coenzima, extintor, acelerador, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con los productos enzimáticos,
 35 catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, iones, etc.

Son etiquetas adecuadas por ejemplo enzimas incluyendo peroxidasas de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa- 6- fosfatodeshidrogenasa, alcoholdehidrogenasa, glucosaoxidasa, β -galactosidasa, luciferasa, ureasa y acetilcolinaesterasa; colorantes; sustancias fluorescentes incluyendo isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, bromuro de etidio, cloruro de 1-sulfonil 5-dimetilaminonaftaleno y quelatos fluorescentes de
 40 tierras raras; sustancias quimioluminescentes incluyendo luminol, isoluminol, compuestos de acridinio, olefinas, enoléteres, enamina, arilviniléteres, dioxeno, arilimidazol, lucigenina, luciferina y aequorina; sustancias que aportan sensibilidad incluyendo eosina, 9, 10- dibromoantraceno, azul de metileno, porfirina, ftalocianina, clorofila, rosa de bengala; coenzimas; sustrato de enzimas; isótopos radioactivos incluyendo ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{57}Co y ^{75}Se ; pueden marcarse partículas incluyendo partículas magnéticas, partículas, preferiblemente partículas de látex que pueden ser marcadas en sí mismas por ejemplo, colorantes, sustancias que aportan sensibilidad,
 45 sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, isótopos u otras etiquetas que pueden ser detectadas; partículas de soles incluyendo soles de oro o de plata; liposomas o células que pueden ser marcadas en sí mismas con etiquetas que pueden ser detectadas; etc. [EP- A2- 0 515 194; US 5, 340, 716; US 5, 545, 834; Bailei et al. (1987) J. Pharmaceutical & Biomedical Analisis 5: 649- 658].

50 Un sistema que forma señal puede incluir también componentes que en la cercanía espacial mutuamente pueden llegar a una interacción comprobable, por ejemplo en forma de donores de energía y receptores de energía como por ejemplo sustancias que aportan fotosensibilidad y sustancias quimioluminiscentes (EP- A2- 0 515 194), sustancias que aportan fotosensibilidad y fluoróforos (WO 95/06877), yodo 125 radioactivo y fluoróforos [Udenfriend et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8672- 8676], fluoróforos y fluoróforos [Mathis (1993) Clin. Chem. 39: 1953- 1959]
 55 o fluoróforos y sustancias que extinguen la fluorescencia (US 3, 996, 345).

Entre una interacción entre los componentes está la transferencia directa de energía entre los componentes, incluyendo por ejemplo por radiación de luz o electrones así como por moléculas químicas reactivas fugaces. Además se incluyen también procesos en los cuales la actividad de un componente es inhibida o fortalecida por uno

u varios otros, por ejemplo la inhibición o elevación de la actividad enzimática o la inhibición, elevación o cambio (por ejemplo desplazamiento de longitudes de onda, polarización) de la radiación electromagnética transmitida por los componentes afectados. La interacción entre los componentes incluye también cascadas enzimáticas. En este caso, los componentes son enzimas, de las cuales por lo menos una entrega el sustrato para otra, de modo que resulta una velocidad de reacción máxima o mínima de la transformación acoplada de sustrato.

Por regla general tiene lugar una interacción efectiva entre los componentes, cuando éstos están presentes uno en la vecindad del otro, por consiguiente por ejemplo dentro de un ámbito de separación inferior a 600 nm, preferiblemente inferior a 400 nm, de modo muy particularmente preferido inferior a 200 nm.

El concepto "asociado" tiene un amplio entendimiento e incluye por ejemplo un enlace covalente y uno no covalente, un enlace directo y uno indirecto, la adsorción sobre una superficie y la inclusión en una cavidad o un espacio hueco, etc. En un enlace covalente están unidos los anticuerpos o asociados de unión mediante un enlace químico a la fase sólida o a la etiqueta. Son ejemplos de un enlace no covalente la adsorción superficial, la inclusión en espacios huecos por la unión de los asociados específicos de unión. Aparte de una unión directa a la fase sólida o a la etiqueta, los anticuerpos o asociados de unión pueden estar unidos a la fase sólida o a la etiqueta también de manera indirecta mediante interacción específica con otros asociados específicos de unión (EP-A2-0 411 945). Para ello son ejemplos: anticuerpos biotinilados que pueden estar unidos a la etiqueta mediante avidina unida a la etiqueta o un conjugado de fluoresceína-anticuerpo, que puede estar unido a la fase sólida mediante anti-fluoresceína-anticuerpos unidos a la fase sólida o un anticuerpo que puede estar unido a la etiqueta o a la fase sólida mediante proteínas que se enlazan con inmunoglobulina.

Otro objetivo de esta invención son anticuerpos acordes con la invención, que son empleados como diagnóstico in vitro o como un componente de un diagnóstico in vitro.

En un diagnóstico in vitro se detecta el analito que va a ser comprobado, por ejemplo una determinada forma P/GF, en una muestra exterior de un cuerpo humano o animal vivo o se determina su concentración o cantidad.

En el sentido de la invención, se entiende por una "muestra" al material que contiene presumiblemente la sustancia que va a ser detectada (se ven ejemplos de esto en EP-A2-0 515 194, "Analito"). El concepto de muestra incluye por ejemplo líquidos o tejidos biológicos en particular de humanos y animales como sangre, plasma, suero, esputo, exudado, lavados bronquioalveolares, líquido linfático, líquido sinovial, líquido seminal, mucosa vaginal, heces, orina, licor, cabellos, piel, cortes o muestras de tejidos. Además se incluyen muestras de cultivos celulares, líquidos o tejidos vegetales, muestras forenses, muestras de agua y agua residual, alimentos, medicamentos. Dado el caso, las muestras tienen que ser tratadas previamente para hacer accesibles los analitos al método de detección o para eliminar los componentes interferentes de la muestra. Tal tratamiento previo de las muestras podría incluir la separación y/o lisis de células, la precipitación, la hidrólisis o la desnaturalización de los componentes de las muestras, como por ejemplo proteínas, la centrifugación de muestras, el tratamiento de las muestras con solventes orgánicos, por ejemplo alcoholes, en particular metanol; el tratamiento de las muestras con detergentes. Frecuentemente se transfiere la mezcla a otro medio, por lo menos acuoso, el cual debería interferir lo mínimo posible con el método de detección.

Los anticuerpos acordes con la invención pueden ser empleados en un método para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito en una muestra, preferiblemente determinadas formas P/GF, en particular fP/GF.

Para una detección cuantitativa se mide la cantidad, la concentración o la actividad (por ejemplo actividad enzimática) del analito en la muestra. En el concepto de la "detección cuantitativa" se incluyen también métodos semicuantitativos, que registran sólo la cantidad, concentración o actividad aproximadas del analito en la muestra o sólo pueden entregar un dato relativo de cantidad, concentración o actividad. Se entiende por una detección cualitativa la detección de la presencia del analito en la muestra principalmente o la indicación de que la concentración o actividad del analito en la muestra está por debajo o por encima de un determinado o varios determinados valores umbral.

Con ello la invención se refiere también a métodos para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito, preferiblemente determinadas formas P/GF, en particular fP/GF, en una muestra y a reactivos adecuados.

Para la detección de analitos se emplean frecuentemente pruebas de unión, en las cuales mediante una unión específica del analito que va a ser detectado sobre asociados de unión específicos para el analito, puede concluirse sobre la presencia, ausencia o cantidad del analito en una muestra. Son ejemplos de pruebas de unión los inmunoensayos o también métodos en los cuales se hibridan oligo- o polinucleótidos.

Las denominadas "pruebas heterogéneas de unión" son reconocidas por una o varias etapas de separación y/o etapas de lavado. La separación puede ocurrir por ejemplo mediante inmunoprecipitación, precipitación con sustancias como polietilenglicol o sulfato de amonio, fijación, separación magnética, unión a una fase sólida. En las

- pruebas heterogéneas de unión en el formato de sándwich, por regla general está unido uno de los asociados específicos de unión del analito a una fase sólida y sirve para la separación del complejo de unión "analito/asociado específico de unión del analito" de la fase líquida, mientras que para la detección del complejo de unión, el otro asociado específico de unión del analito porta una etiqueta detectable, por ejemplo una enzima, una etiqueta de fluorescencia o de quimioluminiscencia, etc.. Se subdivide adicionalmente este método de prueba en las denominadas pruebas de monoetapa-sándwich, en las cuales se incuban de manera simultánea los dos asociados específicos de unión con la muestra y en pruebas de dos etapas- sándwich, en las cuales la muestra es incubada primero con el reactivo de fase sólida y después de una etapa de separación y lavado, se incuba el complejo de unión ligado a la fase sólida de analito y asociado específico de unión del analito con el reactivo de detección.
- 10 En las "pruebas homogéneas de unión" no ocurre ninguna separación entre componentes libres y componentes unidos al complejo "analito/asociado específico de unión del analito", del sistema que forma señal. La carga de la prueba, la cual contiene el asociado específico de unión del analito, los componentes que forma señal y la muestra, son medidos después o incluso durante la reacción de unión sin otra etapa de separación y/o lavado y se determina la correspondiente señal de medición. Son ejemplos de inmunoensayos homogéneos [Boguslaski & Li (1982) Applied Biochemistry and Biotechnology 7: 401-414] métodos turbidimétricos o nefelométricos, donde el asociado específico de unión del analito empleado para la detección puede estar asociado con partículas de látex, como por ejemplo pruebas EMIT®; pruebas CEDIA ®; inmunoensayos de fluorescencia-polarización; inmunoensayos de canalización de oxígeno luminescente [LOCI®, s. EP-A2-0 515 194; Ullman et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 5426-5430; Ullman et al. (1996) Clinical Chemistry 42: 1518-1526] etc. Para un inmunoensayo homogéneo de sándwich, como por ejemplo una prueba nefelométrica de látex, se incuban los reactivos de anticuerpos junto con la muestra y se ejecuta la medición de la señal durante y/o después de incubación, sin que se realice una etapa de separación o lavado antes de la medición. En otras palabras: no ocurre ninguna separación del analito unido al anticuerpo, del analito libre o de anticuerpos que no están unidos a ningún analito.
- 25 Las pruebas homogéneas y heterogéneas de unión pueden ser ejecutadas en forma de un denominado "ensayo de sándwich". Para esto se enlaza el analito por ejemplo para una prueba heterogénea de unión a un asociado específico de unión específico del analito que está asociado a la fase sólida y un asociado específico de unión del analito que está asociado con un componente de un sistema que forma señal. Para inmunoensayos sándwich los anticuerpos o antígenos o haptenos pueden formar el asociado específico de unión del analito.
- 30 Otra forma especial de operar de una prueba de unión heterogénea u homogénea es el "inmunoensayo indirecto". En este caso, el analito es un anticuerpo. Uno de los asociados específicos de unión del analito es el antígeno o por ejemplo un péptido acorde con la invención o un antígeno modificado del anticuerpo que va a ser detectado (= analito), y el otro asociado específico de unión del analito es por regla general una proteína que liga inmunoglobulina como por ejemplo un anticuerpo, la cual fue capaz de ligarse de manera específica al anticuerpo que va a ser detectado (= analito).
- 35 En una "prueba de unión competitiva " homogénea o heterogénea compiten las muestras-analito y reactivo-analito para unirse a un número limitado de asociados específicos de unión del analito. El reactivo-analito es por ejemplo un "analito modificado", como por ejemplo un analito etiquetado o marcado, una sección de analito como por ejemplo los péptidos acordes con la invención o un análogo de analito. Ejemplos para la ilustración del principio: (i) muestra-analito compite con reactivo-analito, el cual está asociado con un componente de un sistema que forma señal, para unirse a asociados específicos de unión del analito en asociación con la fase sólida o (ii) muestra-analito compite con analito asociado a la fase sólida (= reactivo-analito) para unirse con asociados específicos de unión del analito, los cuales están asociados con un componente de un sistema que forma señal.
- 45 La detección de diferentes formas de P/GF con los asociados específicos de unión acordes con la invención, en particular anticuerpos, puede ocurrir también con métodos como por ejemplo Western Blot, Dot Blot, inmunoelectroforesis, inmunofijación-electroforesis, electroinmunodifusión, inmunoprecipitación, inmunodifusión radial, inmunofijación, inmunocromatografía, aglutinación de látex, prueba turbidimétrica o nefelométrica, prueba de unión homogénea o heterogénea, prueba de una o dos etapas, prueba de sándwich, prueba indirecta, prueba competitiva, pruebas de "point-of-care", etc. Éstos y otros métodos de detección son descritos por ejemplo en "Labor y Diagnose", ed. L. Thomas, TH- Boks Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1998, capítulo 60 o en "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- An Introduction to Radioinmunoensayo and Related Techniques", ed. T. Chard, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- 50 El concepto "pruebas de point- of- care " o "pruebas POC " incluye pruebas en las cuales no se requiere análisis separados o aparatos de medición para la ejecución de las pruebas o evaluación de las pruebas. Las pruebas POC se basan en muchos casos en métodos inmunocromatográficos, separaciones de inmunocomplejos por filtración y/o técnicas de inmunofijación. Las pruebas de POC son diseñadas en particular para mediciones en el lugar, por ejemplo en la cama de hospital o en el hogar, para el médico de emergencia y/ o para el médico establecido y menos para el laboratorio grande. Las pruebas POC pueden ser ejecutadas en particular también por personas, que no tienen ninguna formación técnica médica detallada y experiencia en el campo de la medicina de laboratorio. En el

- sentido de esta invención, bajo el concepto de "pruebas POC " se entienden también las denominadas pruebas domésticas o pruebas OTC, las cuales pueden ser ejecutadas por inexpertos en medicina, como por ejemplo las diversas pruebas de embarazo, que son vendidas para el uso doméstico. Otras pruebas POC se refieren por ejemplo a la detección de marcadores de infarto cardíaco, drogas, medicamentos, marcadores de infección e inflamación. En muchas pruebas POC están asociadas o se asocian en el curso de la ejecución de la prueba, asociados específicos de unión en o sobre tiras o filtros de cromatografía. Una reacción positiva o negativa de detección puede estar ligada por ejemplo con la aparición o no aparición de una banda coloreada en un determinado campo de prueba y/o la aparición o no aparición de un determinado símbolo, por ejemplo un "+", un "-" y/o la intensidad de la respectiva señal de medición.
- 5
- 10 Una prueba POC para determinadas formas P/GF, en particular fP/GF, puede estar constituida por ejemplo así: se aplican sobre una tira de prueba la muestra y anticuerpos específicos etiquetados, los cuales pueden unirse a la forma fP/GF, pero no lo hacen o lo hacen escasamente sobre otras formas P/GF. Son etiquetas adecuadas por ejemplo partículas de látex coloreadas, oro coloidal, enzimas, etc. En tanto la forma fP/GF esté presente en la muestra, se forman complejos fP/GF / anticuerpo. Estos complejos se mueven por ejemplo por medio de fuerzas capilares en la dirección sobre un ámbito en el cual hay otros asociados específicos de unión, en particular anticuerpos que tienen la capacidad de unirse a otros epítopes de fP/GF y que están fijados por ejemplo en forma de una banda o se fijan en el curso del método de prueba (por ejemplo sobre un puente biotina-avidina). Los complejos etiquetados de fP/GF /anticuerpo están unidos en este ámbito y forman con el asociado específico de unión fijado, en particular anticuerpos, un complejo sándwich. La intensidad de la señal de la etiqueta aquí es proporcional a la concentración de P/GF-muestra. En una prueba de método competitivo de POC pueden estar fijos por ejemplo fragmentos de anticuerpos en un ámbito de la tira de prueba o fijarse en el curso del método de prueba. Estos anticuerpos habían competido con la forma fP/GF de la muestra para unirse a anticuerpos anti-fP/GF etiquetados. De modo alternativo, para la construcción de una prueba fP/GF competitiva pueden emplearse también anticuerpos fP/GF y proteína fP/GF etiquetados o bien los péptidos acordes con la invención.
- 15
- 20
- 25 Una forma particularmente preferida de operar del método acorde con la invención es una prueba nefelométrica o una prueba turbidimétrica, en particular una prueba tal en la que se usan anticuerpos acordes con la invención - preferiblemente asociados a micropartículas (en particular a partículas de látex).
- Otro objetivo acorde con la invención es un equipo de prueba que contiene uno o varios de los anticuerpos y/o péptidos acordes con la invención. En un equipo tal, comúnmente están presentes todos o sólo algunos componentes de una prueba en forma empacada. Los anticuerpos y/o péptidos acordes con la invención pueden estar asociados por ejemplo con una o varias fases sólidas y/o uno o varios componentes de un sistema que forma señal. El equipo de prueba puede contener por ejemplo estándares, controles así como otros reactivos, como por ejemplo tampones, soluciones de lavado, soluciones que liberan señal de medición y/o sustrato enzima, cubetas, pipetas y/o instrucciones de la prueba. Un equipo de prueba particularmente preferido acorde con la invención contiene en las partículas de látex asociados anticuerpos acordes con la invención y/o péptidos acordes con la invención.
- 30
- 35
- También se emplean anticuerpos y péptidos acordes con la invención para la cromatografía de afinidad. Se entiende bajo el concepto "cromatografía de afinidad" un método para la purificación y aislamiento de sustancias, en particular biopolímeros, el cual consiste en el hecho de que muchas sustancias pueden formar una unión reversible, selectiva, no covalente con asociados específicos de unión para ellas. El principio del método consiste en que el asociado específico de unión se une por regla general de manera covalente a una matriz insoluble (por ejemplo vidrios porosos, geles a base de agarosa, de celulosa, de dextran, de polímeros y de sílica gel) y es puesto en contacto con una muestra que contiene las sustancias. La sustancia investigada es inmovilizada y retenida debido a su interacción específica con asociado específico de unión ligado a la matriz, mientras que todas las otras sustancias presentes en la muestra son separadas mediante elución. A continuación se remueve la sustancia investigada con un agente de elución adecuado, el cual escinde el enlace no covalente entre la sustancia y el asociado específico de unión (ver E. Buddecke, 1989, Grundriss der Biochemie, Walter de Gruyter, capítulo 7 "Proteine").
- 40
- 45
- Otro objetivo de la invención son anticuerpos o asociados específicos de unión acordes con la invención que son empleados en la terapéutica. Esto incluye anticuerpos acordes con la invención o péptidos acordes con la invención en un medio de inyección estéril compatible farmacéuticamente. Se entiende por un medio de inyección estéril compatible farmacéuticamente por ejemplo una solución libre de pirógenos, libre de gérmenes, por ejemplo solución salina u otra solución de electrolitos, como se emplean comúnmente para la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea de medicamentos, vacunas o agentes de contraste.
- 50
- Otro objetivo de esta invención es el empleo de los anticuerpos acordes con la invención como agentes de diagnóstico o como componente de un agente de diagnóstico.
- 55
- Otro objetivo de esta invención es un método para la producción de un anticuerpo acorde con la invención, el cual se caracteriza porque es empleado para la inmunización de uno o varios de los péptidos arriba descritos.

Los anticuerpos acordes con la invención pueden ser producidos también mediante el empleo de proteínas P/GF y VEGF de ocurrencia natural y/o recombinantes, isoformas de proteínas o bien fragmentos de ellas.

5 Otro objetivo de la invención es el empleo de proteínas, isoformas de proteína, fragmentos, productos de degradación, homólogos, y péptidos acordes con la invención como materiales de referencia, estándares, estándares para calibración y controles. Son materiales de referencia los materiales o sustancias que poseen propiedades que están establecidas de modo que se emplean materiales de referencia como agentes de calibración, estándares y controles. Además los materiales de referencia pueden ser empleados para la validación de métodos de medición y para la asignación de determinados valores, en particular "valores correctos convencionales". Para los 10 controles de calidad y aseguramiento de calidad, es importante el empleo de materiales de referencia como agentes de calibración, estándares y controles como el empleo de agentes de calibración estándares y controles, que se refieren también a materiales de referencia o bien los "valores correctos convencionales" allí indicados.

Los péptidos empleados como antígeno de inmunización pueden ser utilizados para la inmunización de forma no ligada y/o ligados al soporte.

15 Son por ejemplo soportes típicos las proteínas, como por ejemplo la ovoalbúmina, albúmina o hemocianina de lapa de Keyhole (KLH), o polímeros, como por ejemplo polietilenglicol, poliacrilamida o poli- d- glutamina- d- lisina. Los péptidos pueden estar ligados a este soporte por ejemplo con ayuda de carbodiimida o glutaraldehído o también pueden actuar por medio de un reactivo heterobifuncional, el cual también puede actuar como separador ("*Spacer*"), como por ejemplo éster de N- maleimidobutiriloxisuccinimida (GBMS). Para otros ejemplos y métodos de 20 acoplamiento ver Wong, S. (1993) Chemistry of Protein Conjugation and Cross- Linking, CRC Press, Inc., Boca Raton.

El antígeno de inmunización es recogido por ejemplo en solución salina de tampón de fosfato y se le añade adyuvante de ratón Inmuno Easy. Esta emulsión puede ser aplicada entonces por ejemplo por vía intradérmica, intraperitoneal y/o subcutánea a un animal, por ejemplo conejos, un ratón, una rata, un cobayo, caballo, un asno, una oveja, una cabra, un pollo etc.. Las inyecciones con dosis adicionales de antígeno, donde el antígeno de 25 inmunización puede estar emulsificado también con adyuvante incompleto de Freund, pueden ayudar a elevar la inmunorespuesta.

Los anticuerpos policlonales acordes con la invención pueden ser obtenidos del antisuero de los animales inmunizados y pueden ser purificados adicionalmente por cromatografía de afinidad sobre una matriz sobre la cual 30 por ejemplo están unidas las correspondientes formas P/GF o los péptidos empleados como antígeno de inmunización.

Para generar anticuerpos monoclonales acordes con la invención, se fusionan según los métodos generalmente conocidos [s.a. Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Peters et al. (1985) Monoklonale Antikörper: Herstellung y Charakterisierung, Springer Verlag] las 35 inmunocélulas de animales inmunizados, como por ejemplo un ratón o un conejo con células de mieloma para la generación de células de hibridoma que producen anticuerpos y a continuación se aíslan y separan los clones adecuados. La elección de los clones que producen los anticuerpos monoclonales deseados es realizada con ayuda de métodos específicos de discriminación. Para esto se confirma la especificidad de unión de los anticuerpos suministrados en el paso de cultivo celular, por ejemplo en el antígeno de inmunización o un eventual soporte del 40 antígeno de inmunización por medio de inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo y/o Western Blot. Los hibridomas, que producen anticuerpos acordes con la invención, son multiplicados de manera clonal. Las líneas de células de hibridoma así obtenidas están disponibles entonces para una producción duradera de anticuerpos monoclonales. Se obtienen mayores cantidades de anticuerpos por ejemplo a través de sobrenadante de cultivos celulares, en particular de fermentadores o cultivos que se enrollan así como de ascitis.

45 Dependiendo del propósito deseado de aplicación, es ventajoso emplear sólo parte de los anticuerpos, como por ejemplo fragmentos de Fab, F (ab')₂, o Fab'. Estos pueden ser generados por ejemplo con métodos de escisión enzimática conocidos por los expertos [ver Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor].

Las posiciones de unión del antígeno de un anticuerpo se encuentran en los denominados dominios variables, los cuales son codificados mediante los genes V. Con los métodos de técnica genética conocida [por ejemplo Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2^a edición; McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552-554] puede determinarse también la secuencia correspondiente de ácido 50 nucleico de un anticuerpo acorde con la invención, así como mediante ello se había conocido ya también la correspondiente secuencia de aminoácidos, en tanto ésta no había sido conocida todavía por determinación de secuencia de aminoácidos. Como materiales de partida para tales análisis pueden emplearse las células de 55 hibridoma o bien las inmunocélulas que producen anticuerpos, de animales inmunizados.

- En el conocimiento de las secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos pueden producirse con ayuda de métodos comunes de tecnología genética y biología molecular [s.a. Johnson & Chiswell (1993) Current Opinion in Structural Biology 3: 564- 571], entonces anticuerpos humanizados quiméricos, bi- u oligoespecíficos así como péptidos derivados de la "región determinante de complementariedad", ("unidades mínimas de reconocimiento"), fragmentos de cadena simple, y/ o productos funcionales de fusión, por ejemplo estructuras de anticuerpo-enzima producidos de manera recombinante [s.a. Larrick & Fry (1991) Human Antibodies and Hybridomas 2: 172- 189; Kitano et al. (1986) Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 282- 286; Thompson et al. (1986) J. Immunol. Methods 94: 7- 12], los cuales se ligan sobre los respectivos epítopes específicos de las formas P/GF, en particular en un péptido acorde con la invención. Con tales péptidos incluidos dentro del concepto "anticuerpos" puede alcanzarse por ejemplo una disminución de la inmunogenicidad y/o una eficacia fortalecida en la administración como medicamento o agente de diagnóstico in vivo, y/o surgen ventajas para el empleo como o en un diagnóstico in vitro. Los anticuerpos pueden ser producidos también, dado el caso bajo utilización de métodos de tecnología genética, en mohos como por ejemplo células de levaduras [Fischer et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825- 839; Hiatt et al. (1992) Genetic Engineering 14: 49- 64], células vegetales, animales y procarióticas (ver WO 95/25172) así como células humanas aisladas.
- Otro objetivo de esta invención son también mohos, células animales, vegetales o procarióticas así como células humanas aisladas, que producen un anticuerpo acorde con la invención. Una forma preferida de operar de esta invención incluye líneas de células de hibridoma, que producen los anticuerpos acordes con la invención.

Los ejemplos descritos a continuación sirven para dilucidar de manera ejemplar aspectos individuales de esta invención.

20 Ejemplo 1: Producción de anticuerpos monoclonales específicos de fP/GF

a) Inmunización de ratones

- Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones BALB/c en cada caso con 20 µg de antígeno de inmunización (sobre péptido unido a KLH con la LRCTGCCGDENLHCVPVET (LAN 2)) en adyuvante de ratón Inmuno Easy (Qiagen GmbH, Alemania). Se sintetizó IAN 2 por medio de una síntesis de fase sólida según métodos generales conocidos. Después de 4 y 8 semanas ocurrió una inyección adicional de antígeno con en cada caso 20 µg de antígeno de inmunización sin adyuvante. Los últimos 3 días antes de la fusión se aplican a los ratones dosis adicionales de antígeno por vía intravenosa con en cada caso 10 µg de antígeno de inmunización.

b) Fusión

- Después de la muerte de los ratones por inhalación de CO₂ se extraen los bazo y se producen suspensiones de células individuales en medio Dulbecco Eagle modificado libre de suero (DMEM; PAN Biotech GmbH, Alemania). Se someten a centrifugación las células (652 x g) y se lavan 2 veces en DMEM. A continuación se determina el número de células por medio de coloración de azul de tripano. A aproximadamente 10⁸ células de bazo se añaden 2x10⁷ células de mieloma (Sp2/0). Después de realizar la centrifugación (360 x g) se descarta el sobrenadante, se añade 1 ml de solución de polietilenglicol (PEG 4000, Merck Eurolab GmbH, Alemania; aproximadamente al 50 % en DMEM) sobre las pellas de células y se someten a incubación después de suspenderlas nuevamente por 1 minuto a 37 °C. A continuación se añaden aproximadamente 10 ml de DMEM y se incuba por 2 a 4 minutos a temperatura ambiente. Se separan por centrifugación las células fusionadas (326 x g) y se suspenden nuevamente las ellas en DMEM + 10 % de suero fetal de ternero (Bio Whittaker Europa, Bélgica) + medio HAT (CC Pro GmbH, Alemania) y se colocan en placas de cultivo celular de 24 pozos (Corning Costar GmbH, Alemania). La concentración celular aproximada es de 5 x 10⁴ a 5 x 10⁶ células por pozo.

Después de 2 a 3 semanas se retiran las colonias surgidas de células (híbridas) y se transfieren a nuevas placas de cultivo.

c) Discriminación

- La especificidad de los anticuerpos liberados en el cultivo celular es probada en una primera etapa de ensayo con ayuda de placas Mikrotiter (Nunc GmbH & Co. KG, Alemania), que están revestidas con un péptido con la secuencia de aminoácidos LRCTGCCGDENLHCVPVET.

- A cada cavidad de la placa Mikrotiter se transfieren con pipeta 100 µl de sobrenadante de cultivo celular (dilución 1: 2) y se incuba por 1 hora a + 15 a + 25 °C. Después de lavar dos veces la placa con solución de lavado POD (OSEW; Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) se añaden a cada cavidad 100 µl de conjugado de anti- ratón IgG/F (ab')₂- POD (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incuba por 1 hora a + 15 a + 25 °C. Después de dos lavados adicionales de la placa se añaden a cada cavidad 100 µl de solución cromógena TMB (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incuba por otros 30 minutos a + 15 a + 25 °C. Después de incubación se añaden a

cada cavidad 100 µl de solución de interrupción POD (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se evalúan las placas Mikrotiter en el BEP II (Behring-ELISA- Prozessor II, Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) a 450 nm.

En una segunda etapa de la prueba se comprueban en el mismo formato de prueba una vez más los híbridos después de separación como se describió arriba.

5 d) Clonación

Se clonan células individuales de híbridos, las cuales producen anticuerpos específicos fP/GF, con un micromanipulador (Leitz Messtechnik GmbH, Alemania). Se purifican sobrenadantes de cultivo de estos clones como se describe bajo g) y son caracterizados como se describe en detalle bajo e), h) y i).

e) Determinación de la subclase de los anticuerpos

- 10 Se determina la subclase de los anticuerpos contra fP/GF por medio de equipo Isotyping de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip™ de la compañía Boehringer Mannheim, Alemania.

f) Producción de los anticuerpos

- 15 Para la producción de grandes cantidades de anticuerpos se transfieren los correspondientes clones celulares a frascos de enrollado (Coming Costar GmbH, Alemania), y se lleva hasta el volumen final deseado a + 37 °C. Después de esto se filtra la suspensión de cultivo de enrollado para la eliminación de las células, sobre filtros de 0,22 µm. La solución de anticuerpos ahora libre de células es concentrada sobre ultrafiltros (límite de separación 30.000 Dalton) y purificada a continuación.

g) Purificación de los anticuerpos

- 20 La solución obtenida de anticuerpos es amortiguada a un pH de 8,6 con tampón de fosfato 0,14 M y aplicada sobre una columna de cromatografía llena con rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences Europe GmbH, Alemania) (por cada 10 mg de anticuerpos que van a ser purificados se emplea 1 ml de rProtein A Sepharose™ Fast Flow). Todos los componentes no unidos son eliminados mediante lavado de la columna con tampón de fosfato 0,14 M de pH 8,6. Los anticuerpos unidos son eluidos de la columna con ácido cítrico 0,1 M de pH 3,0 y se les realiza diálisis contra acetato de sodio 0,05 M + NaCl 0,5 M + Tris 0,05 M + azida de sodio 0,01 % pH 7,0.

25 h) Selección de anticuerpos adecuados para un sándwich fP/GF ELISA

Se investiga la reacción de los anticuerpos monoclonales anti-fP/GF con el epítipo específico fP/GF (por ejemplo el péptido con la secuencia aminoácidos LRCTGCCGDELHLCVPVET):

Reacción con fP/GF:

- 30 Como fase sólida se emplea una placa Mikrotiter, que está revestida con fP/GF. Después de ello se incuban anticuerpos anti-fP/GF de sobrenadante de cultivo. Después de una etapa de lavado se detecta con subsiguiente reacción de coloración, una unión del anticuerpo al P/GF por un conjugado que consiste en anticuerpos policlonales anti-ratón de conejo, y la enzima peroxidasa.

Reacción con un complejo sFlt-1 / P/GF:

Como fase sólida se emplea una placa Mikrotiter, la cual está revestida con fP/GF. Después de ello se incuba sFlt-1.

- 35 El sFlt-1, que es empleado aquí para ello, es "VEGF R1 (Flt-1)/Fc quimérico recombinante humano" de R&D Systems (número de catálogo: 321-FL o bien 321-FL/CF). Después de una etapa de lavado se incuba el anticuerpo anti-fP/GF de sobrenadantes del cultivo. Después de una etapa de lavado no se detecta ninguna o se detecta sólo una pequeña unión de anticuerpos específicos anti-fP/GF, puesto que las posiciones de unión son ocupadas predominantemente por sFlt-1. Los anticuerpos no específicos fP/GF ligan adicionalmente también al complejo sFlt-1 / P/GF, es decir gP/GF. Después de una etapa de lavado se detecta con subsiguiente reacción de coloración una unión de estos anticuerpos no específicos a través de un conjugado, consistente en anticuerpos policlonales anti-ratón de conejo, y la enzima peroxidasa.
- 40

- 45 En este sistema de prueba son los anticuerpos específicos fP/GF los que en la reacción con un complejo sFlt-1 /P/GF no muestran ninguna o muestran una claramente reducida reacción de coloración comparada con la de la reacción con un péptido específico fP/GF.

De modo correspondiente se seleccionan los anticuerpos específicos fP/GF. Se investiga la aptitud de estos anticuerpos para el empleo como anticuerpos de fase sólida en un sándwich-ELISA con anticuerpos conjugados específicos fP/GF, el cual está acoplado a peroxidasa de rábano con un método conocido por los expertos (por ejemplo conjugación de Nakane).

- 5 La comprobación de la aptitud ocurre en el sándwich-ELISA, como se describe en el ejemplo 2a). Los criterios esenciales de decisión para la aptitud son una diferenciación clara entre fP/GF y complejo de sFlt-1 / P/GF. Otros criterios son el límite inferior de detección, y la linealidad de la curva de calibración.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpos monoclonales específicos fP/GF

a) Inmunización de ratones

- 10 Se inmunizan por vía intraperitoneal ratones BALB/c en cada caso con 20 µg de antígeno de inmunización (sobre péptido unido a KLH con la GCCGDENLHK (IAN 2-1-1K)) en adyuvante de ratón Inmuno Easy (Qiagen GmbH, Alemania). Se sintetizó IAN 2-1-1K por medio de una síntesis de fase sólida según métodos generales conocidos. Se examinó la pureza de IAN 2-1-1K por medio de cromatografía en columna (columna: Merck 250 x 4 mm). Para esto se empleó como tampón A: 0,1 % TFA/agua y como tampón B: 0,08 % FFA/acetonitrilo. La tasa de flujo fue 0.8 ml. La detección ocurrió a 220 nm. Además se ejecutó una espectrometría de masas de ionización desorción por láser de matriz asistida (MALDI-MS). El pico principal estaba en 1075 m/z. Después de 4 y 8 semanas ocurrió una inyección adicional de antígeno con en cada caso 20 µg de antígeno de inmunización sin adyuvante. Los últimos 3 días antes de la fusión se aplicaron a los ratones inyecciones adicionales de antígeno por vía intravenosa con en cada caso 10 µg de antígeno de inmunización.
- 20 La fusión b), la clonación d), la determinación de las subclases e), la producción de los anticuerpos f), la purificación de los anticuerpos g) y la selección de anticuerpos adecuados para un sándwich ELISA fP/GF h) ocurrió como en el ejemplo 1. La discriminación c) es desarrollada así mismo como en el ejemplo 1, con la excepción de que la especificidad de los anticuerpos liberados en el cultivo celular es probada en una primera etapa de ensayo con ayuda de placas Mikrotiter (Nunc GmbH & Co. KG, Alemania), las cuales están revestidas con un péptido con la secuencia aminoácidos GCCGDENLHK (IAN: 2-1-1K).
- 25

Ejemplo 3: Detección de fP/GF en una muestra

a) Método de prueba A

Se emplean anticuerpos peroxidasa- conjugada anti- P/GF en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-fP/GF acorde con la invención en un inmunoensayo enzimático según el principio de sándwich.

- 30 Durante la primera incubación se liga el fP/GF contenido en la muestra -en tanto esté presente- al anticuerpo acorde con la invención, el cual está dirigido contra fP/GF, anticuerpo que está fijado en la superficie de las cavidades de una placa de microtitulación. Después del lavado de las cavidades se emplean en una segunda reacción de unión anticuerpos peroxidasa-conjugados anti-P/GF, que están dirigidos contra un epítpe cualquiera de P/GF, exceptuando el epítpe que se liga al receptor. En principio, con ayuda de anticuerpos específicos conjugados peroxidasa anti-P/GF puede detectarse en este método de prueba también la presencia de determinadas isoformas P/GF. Por ejemplo puede emplearse un anticuerpo específico P/GF-1 para la detección de P/GF-1, etc.. En principio también es posible la detección de la presencia de diferentes isoformas P/GF con diferentes anticuerpos específicos. El exceso de anticuerpo conjugado con enzimas es retirado con el lavado. A continuación se determina en las cavidades la actividad de la enzima unida. La transformación enzimática de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina es interrumpida mediante adición de ácido sulfúrico diluido. La intensidad del color proporcional a la concentración de antígeno fP/GF es determinada fotométricamente a una longitud de onda de 450 nm y es bien sea evaluada en un punto determinado o cuantificada mediante una curva de calibración de estándares.
- 40

Tal inmunoensayo de sándwich acorde con la invención detecta fP/GF de manera específica en sólo un método de prueba.

45 b) Método de prueba B

Según el principio de sándwich, en un inmunoensayo enzimático se emplean anticuerpos conjugados de peroxidasa, monoclonales anti- fP/GF acordes con la invención en combinación con un anticuerpo monoclonal anti- fP/GF acorde con la invención.

- 50 Como en el método de prueba A, durante la primera incubación se liga el fP/GF contenido en la muestra - en tanto esté presente - a los anticuerpos dirigidos contra fP/GF acordes con la invención, los cuales están fijos a la superficie

5 de las cavidades de una placa de microtitulación. Después del lavado de las cavidades en una segunda reacción de unión, se emplea anticuerpo conjugado de peroxidasa anti-fP/GF. El exceso de anticuerpos conjugados con enzima es retirado durante el lavado. A continuación se determina la actividad de enzima ligada en las cavidades. La transformación enzimática de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina es interrumpida mediante adición de ácido sulfúrico diluido. La intensidad del color proporcional a la concentración de antígeno fP/GF es determinada fotométricamente a una longitud de onda de 450 nm y evaluada bien sea de manera cualitativa en un punto determinado o cuantificada mediante una curva de calibración de estándares.

10 Tal inmunoensayo de sándwich acorde con la invención detecta fP/GF específicamente en sólo un método de prueba. Por ello el método de prueba B es preferido en particular, porque fP/GF en general está presente como homodímero, por ejemplo como homodímero fP/GF-1, y puede estar unido a ambos polos del homodímero receptor. En el método de prueba B se emplea un inmunoensayo enzimático según el principio del sándwich el cual emplea un anticuerpo anti-fP/GF inmovilizado y un anticuerpo conjugado de peroxidasa anti-fP/GF, de modo que se determina predominantemente fP/GF b, el cual no exhibe asociado de unión en ningún polo.

15 De modo correspondiente a los ejemplos y métodos de prueba descritos, pueden determinarse de manera análoga también las especificidades de los otros asociados de unión acordes con la invención, en particular de los anticuerpos, y emplearse para diagnóstico.

Ejemplo 4: Producción de otros anticuerpos monoclonales específicos de fP/GF

20 Los siguientes anticuerpos monoclonales fueron producidos, seleccionados e investigados respecto a su reconocimiento de formas libres y unidas de P/GF, de manera correspondiente al ejemplo 1. Para la inmunización se emplearon los antígenos de inmunización indicados en las siguientes tablas. El anticuerpo "MAB264" de R&D Systems es un anticuerpo del estado de la técnica que no fue producido aquí.

Anticuerpo monoclonal	Antígeno de inmunización	Especificidad
05-54/04 05-64/026 05-81-05 05-81-010 (Grupo 1)	P/GF humano recombinante; R&D Systems, número de catálogo: 264-PG/CF	P/GF libre
05-61/016 05-63/020 (anticuerpo de comparación)	P/GF humano recombinante; R&D Systems, Nr de catálogo: 264-PG/CF	P/GF libre y unido
05-164/012 05-164/038 05-164/042 05-164/054 (Grupo 2)	IAN 3-3-1 (RSGDRPSYVELT)	P/GF libre

(continuación)

Anticuerpo monoclonal	Antígeno de inmunización	Especificidad
05-121/06 05-120/03 (Grupo 3)	IAN 1-1-2 (VVPFQEVWGRSY)	P/GF libre
R&D Systems MAB264 (anticuerpo de comparación, estado de la técnica)		P/GF libre y unido

5 Los cultivos celulares que producen los anticuerpos monoclonales acordes con la invención o los anticuerpos de comparación, indicados en la tabla fueron depositados en el DSMZ (Deutsche Sammlung de Mikroorganismen y Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, República Federal de Alemania, según el acuerdo de Budapest bajo el número de ingreso asignado de las posiciones internacionales de depósito, indicado a continuación

Cultivo celular 2005-81-05 = DSM ACC2764

Cultivo celular 2005-81-010 = DSM ACC2765

10 Cultivo celular 2005-64/026 = DSM ACC2766

Cultivo celular 2005-63/020 = DSM ACC2767

Cultivo celular 2005-61/016 = DSM ACC2768

Cultivo celular 2005-54/04 = DSM ACC2769

Cultivo celular 2005-164/054 = DSM ACC2770

15 Cultivo celular 2005-164/042 = DSM ACC2771

Cultivo celular 2005-164/038 = DSM ACC2772

Cultivo celular 2005-164/012 = DSM ACC2773

Cultivo celular 2005-121/06 = DSM ACC2774

Cultivo celular 2005-120/03 = DSM ACC2775

20 La fecha de depósito para todos los cultivos celulares mencionados arriba es el 23.03.2006.

Ejemplo 5: Reactividad de los anticuerpos acordes con la invención y de los anticuerpos de comparación con P/GF recombinante (libre)

Se revistieron placas de microtitulación (compañía Nunc, Typ B), con anticuerpos policlonales contra IgG /F(ab)2 de ratón (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania); concentración de revestimiento 10 µg/ml ≈ 1,5 µg/ cavidad.

25 Se transfirieron con pipeta a las cavidades de la placa de microtitulación 100 µl de los anticuerpos monoclonales que iban a ser investigados, en una concentración a) 1,0 µg/ml o b) 0,1 µg/ml y se incubaron por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD (número del producto: OSEW; compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) se añadieron a cada cavidad 100 µl de una solución de P/GF recombinante (R&D Systems, número de catálogo: 264-PG/CF) en una concentración de 0,1 µg/ml y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD se colocaron en cada cavidad 100 µl de conjugado P/GF- POD anti- humano (producido por medio de un método

5 convencional de conjugación de "anticuerpo policlonal purificado por afinidad P/GF humano", producto número: AF-264- PB / R&D Systems) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar otras tres veces las placas de microtitulación, se depositaron en cada cavidad 100 µl de solución de cromógeno TMB (producto número: OUVF, compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de incubación se depositaron en cada cavidad 100 µl de solución de interrupción POD (número de producto: OSFA, compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se evaluó la placa de microtitulación en el BEP II (compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) a 450 nm. En la tabla 1 se listan los resultados.

ES 2 441 210 T3

Tabla 1: Determinación de la reactividad con P/GF mediante evaluación con placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm.

Concentración de anticuerpos [µg/ml]	Extinción a 450 nm											
	Anticuerpos acordes con la invención, Grupo 1				Anticuerpos acordes con la invención grupo 2				Anticuerpo acorde con la invención, grupo 3	Anticuerpo comparación	de	Anticuerpos, según el estado de la técnica
	05.54/ 04	05-64/ 026	05-81- 05	05-81- 010	05-164/ 012	05-164/ 038	05-164/ 042	05-164/ 054	05-121/06	05-61/016	05-63/020	R&D Systems: MAB264
1,0	2,5	2,5	2,5	2,5	0,323	0,370	0,389	0,396	1,343	2,5	2,5	2,5
0,1	2,5	2,073	0,659	0,609	0,099	0,145	0,138	0,126	0,177	2,5	2,5	1,896

Ejemplo 6: Reactividad de los anticuerpos acordes con la invención, de los anticuerpos de comparación y de los anticuerpos del estado de la técnica con complejo P/GF/sFlt-1 (gP/GF)

Se revistieron placas de microtitulación (compañía Nunc, tipo B), con anticuerpos policlonales contra IgG/Fc humano (compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania). Concentración de revestimiento 2,5 µg/ml ≈ 0,376 µg/cavidad.

- 5 En las cavidades de la placa de microtitulación se colocaron en cada caso 100 µl de una solución de VEGF R1 (Flt-1) /Fc recombinante humano, quimérico: R&D Systems, número de catálogo: 321- FL/CF) en una concentración de 1 µg/ml y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD (ver ejemplo 5) se añadieron para la producción del complejo P/GF/ sFlt- 1 en cada cavidad 100 µl de una solución de P/GF recombinante (ver ejemplo 5) en una concentración de 1 µg/ml y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C.
- 10 Después de lavar tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD se transfirieron con pipeta a cada cavidad 100 µl de los anticuerpos monoclonales que iban a ser investigados, con una concentración de a) 1 µg/ml o b) 0, 1 µg/ml y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD se colocaron en cada cavidad 100 µl de conjugado anti-ratón IgG/F (ab)2- POD (compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C.
- 15 Después de otros tres lavados de las placas de microtitulación, se colocaron en cada cavidad 100 µl de solución cromógena TMB (ver ejemplo 5) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de incubación se colocaron en cada cavidad 100 µl de solución de interrupción POD (ver ejemplo 5) y se evaluaron las placas de microtitulación en el BEP II (ver ejemplo 5) a 450 nm. Los resultados están listados en la tabla 2.

ES 2 441 210 T3

Tabla 2: Determinación de la reactividad con complejo P/GF/sFlt-1 mediante evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm.

Concentración de anticuerpos [µg/ml]	Extinción a 450 nm											
	Anticuerpos acordes con la invención, Grupo 1				Anticuerpos acordes con la invención grupo 2				Anticuerpo acorde con la invención, grupo 3	Anticuerpo de comparación		Anti-cuerpos, según el estado de la técnica
	05.54/04	05-64/026	05-81-05	05-81-010	05-164/012	05-164/038	05-164/042	05-164/054	05-121/06	05-61/016	05-63/020	R&D Systems: MAB264
1,0	0,036	0,032	0,043	0,045	0,027	0,026	0,029	0,023	0,028	2,500	2,500	0,691
0,1	0,035	0,028	0,026	0,026	0,022	0,023	0,023	0,023	0,028	0,692	0,750	0,217

Los anticuerpos acordes con la invención no muestran ninguna reacción con el complejo P/GF/sFlt-1 formado. Donde los anticuerpos de comparación y los anticuerpos del estado de la técnica muestran una clara reacción.

Ejemplo 7: Determinación del mapa de epítipo

5 Se produjeron mapas de péptidos que se traslapan, que se habían derivado de la secuencia de P/GF humano (péptidos 13-méricos, en los que se traslapan 11 aminoácidos), con ayuda en la tecnología de síntesis SPOT. Los métodos se describen en: Wenschuh, H. et al. (2000) "Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides", Biopolymers (Peptide Science), 55:188-206. Los péptidos fueron sintetizados en una disposición definida (como "arreglo de péptidos") por etapas en membranas de celulosa, de modo que ellos están presentes acoplados de manera covalente a la membrana de celulosa. Las pruebas de unión para comprobar la inmuno-reactividad de los péptidos fueron ejecutadas inmediatamente sobre el arreglo. El protocolo de incubación para ello transcurrió como sigue:

- Igualación en tampón TBS, pH 8.0
- 2 h con tampón de bloqueo, pH 8.0
- 2 h de incubación de anticuerpos (3 µg/ml) en tampón de bloqueo, pH 8.0
- 15 • lavado con TBS (0.05% Tween 20)
- 2 h de incubación con anti- ratón- IgG- POD en tampón de bloqueo, pH 8.0
- 3 lavados x 5 min con TBS (0.05% Tween 20)
- detección por medio de quimioluminiscencia (Lumi- Imager), Roche Diagnostics)

20 Resultados: los dos anticuerpos 05-81-05 y 05-81-010 acordes con la invención del grupo 1 reacción con los siguientes cortes de secuencia:

1. EKMKPERCGDAVP
2. MKPERCGDAVPRR

La secuencia reconocida es idéntica al dominio terminal en C de P/GF-1.

Pruebas adicionales sobre la fase sólida con anticuerpos monoclonales que van a ser investigados:

25 En los siguientes ejemplos 8 y 9 se investigaron exclusivamente los anticuerpos de alta afinidad del grupo 1 en comparación con los del estado de la técnica y los anticuerpos de comparación.

Ejemplo 8: Reacción con P/GF

30 Se recubrieron placas de microtitulación (ver ejemplo 5), con los anticuerpos monoclonales acordes con la invención, con los anticuerpos de comparación y con anticuerpos monoclonales del estado de la técnica. Concentración de revestimiento 3 µg/ml ≈ 0,45 mg/cavidad.

35 Se transfirieron con pipeta a las cavidades de las placas de microtitulación 100 µl de una sucesión geométrica de dilución comenzando con 50 ng/ml de P/GF recombinante (ver ejemplo 5) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar tres veces las placas con solución de lavado POD (ver ejemplo 5) se depositaron en cada cavidad 100 µl de conjugado anti- humano- P/GF- POD (ver ejemplo 5) y se incubó por 1,5 horas a +15 a +25°C. Después de lavar otras tres veces la placa se depositaron en cada cavidad 100 µl de solución de cromógeno TMB (ver ejemplo 5) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de la incubación se depositaron en cada cavidad 100 µl de solución de interrupción POD (ver ejemplo 5) y se evaluaron las placas de microtitulación en el BEP II (ver ejemplo 5) a 450 nm. Los resultados se listan en la tabla 3.

40

Tabla 3: Determinación de la reactividad con P/GF mediante evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm

Conc [ng/ml]	Extinción a 450 nm							
	Anticuerpos acordes con la invención, Grupo 1				Anticuerpos de comparación		Anticuerpo según el estado de la técnica	
	05-54/04	05-64/026	05-81-05	05-81-010	05-61/016	05-63/020	R&D Systems: MAB264	
P/GF recombinante humano	50	2,500	2,500	1,603	2,074	2,500	2,500	2,500
	25	2,500	2,500	1,134	1,706	2,500	2,500	1,467
	12,5	2,500	1,926	0,610	1,154	2,500	2,500	0,885
	6,25	1,737	1,408	0,805	0,752	1,782	2,049	0,468
	3,13	1,144	0,819	0,394	0,413	1,165	1,330	0,232
	1,56	0,763	0,583	0,363	0,255	0,712	0,818	0,081
	0,78	0,406	0,376	0,234	0,143	0,414	0,456	0,050

5 **Ejemplo 9: Reactividad de los anticuerpos acordes con la invención, de los anticuerpos de comparación y de los anticuerpos del estado de la técnica con complejo P/GF/sFlt-1 (gP/GF)**

Se revistieron placas de microtitulación (ver ejemplo 5), con los anticuerpos monoclonales acordes con la invención, con anticuerpos de comparación y con anticuerpos monoclonales del estado de la técnica. Concentración de revestimiento 3 µg/ml ≈ 0,45 mg/cavidad.

10 En un recipiente de reacción se produjo una serie geométrica de dilución comenzando con 25 ng/ml de P/GF recombinante. A cada dilución se dosificó VEGF R1 (Flt-1)/Fc recombinante humano quimérico (ver ejemplo 6) en una concentración de 400 ng/ml y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. A continuación se transfirieron con pipeta en cada caso 100 µl a las cavidades en la placa de microtitulación y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar cuatro veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD (ver ejemplo 5) se colocaron en cada

15 cavidad 100 µl de conjugado anti-humano-VEGF R1-POD (compañía R&D Systems, parte 891096 de inmunoensayo Quantikine Human VEGF R1; DVR100B) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de otro lavado por tres veces de las placas de microtitulación se colocaron en cada cavidad 100 µl de solución de cromógeno TMB (ver ejemplo 5) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de la incubación se colocaron en cada cavidad 100 µl de solución de interrupción POD (ver ejemplo 5) y se evaluaron las placas de microtitulación en el BEP II (ver ejemplo 5) a 450 nm. Los resultados se listan en la tabla 4.

20 Tabla 4: Determinación de la reactividad con complejo P/GF/sFlt-1 mediante evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm.

ES 2 441 210 T3

Concentración [ng/ml]		Extinción a 450 nm						
		Anticuerpos acordes con la invención, grupo 1				Anticuerpos de comparación		Anticuerpos según el estado de la técnica
P/GF	VEGF R1	05-54/04	05-64/026	05-81-05	05-81-010	05-61/016	05-63/020	R&D Systems: MAB264
25	400	0,079	0,143	0,260	0,204	1,772	2,500	2,188
12,5	400	0,047	0,099	0,264	0,105	1,642	2,045	1,611
6,25	400	0,038	0,071	0,116	0,088	0,936	1,530	0,883
3,13	400	0,04	0,069	0,072	0,059	0,477	0,868	0,529
1,56	400	0,037	0,068	0,046	0,049	0,278	0,404	0,272
0,78	400	0,038	0,063	0,042	0,045	0,177	0,282	0,146
0,39	400	0,047	0,073	0,043	0,049	0,116	0,189	0,094

5 Los anticuerpos acordes con la invención no reconocen el complejo P/GF/sFlt-1 o bien lo hacen sólo muy débilmente. Ellos son específicos para P/GF libre, mientras que los anticuerpos de comparación y los anticuerpos del estado de la técnica muestran reacciones claras, por consiguiente no son específicos para P/GF libre.

La presente invención está expresamente descrita también por las siguientes reivindicaciones, sin que sin embargo la invención se limite a ellas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dade Behring Marburg GmbH

10 <120> Asociado de unión de factor de crecimiento placentario, en particular anticuerpos dirigidos contra factor de crecimiento placentario, su producción y empleo

<130> 05/016 DBM

<150> DE 10 2005 022 047.9

<151> 2005-05-09

15 <160> 63

<170> versión de patente 3.3

<210> 1

<211> 149

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 1

```

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
1      5      10     15
Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20     25     30
Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35     40     45
Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50     55     60
Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65     70     75     80
Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
85     90     95
Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100    105   110
Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115    120   125
Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
130    135   140
Ala Val Pro Arg Arg
145

```

5 <210> 2

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptidos

<400> 2

Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
 20 25 30
 Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
 50 55 60
 Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
 65 70 75 80
 Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
 85 90 95
 Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
 100 105 110
 Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala
 115 120 125
 Val Pro Arg Arg
 130

<210> 3

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 3

Met Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
 20 25 30
 Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
 50 55 60
 Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
 65 70 75 80
 Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
 85 90 95
 Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
 100 105 110
 Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala
 115 120 125
 Val Pro Arg Arg
 130

10

<210> 4

<211> 153

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 4

```

Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
1      5      10      15
Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
20     25     30
Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
35     40     45
Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
50     55
Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
65     70     75     80
Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
85     90     95
Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
100    105    110
Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys
115    120    125
Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His
130    135    140
Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
145    150

```

10

<210> 5

<211> 204

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 5

Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
 20 25 30
 Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
 50 55 60
 Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
 65 70 75 80
 Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
 85 90 95
 Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
 100 105 110
 Cys Arg His Ser Pro Gly Arg Gln Ser Pro Asp Met Pro Gly Asp Phe
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ala Pro Ser Phe Leu Pro Pro Arg Arg Ser Leu Pro Met
 130 135 140
 Leu Phe Arg Met Glu Trp Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ser Gln Ser Ala
 145 150 155 160
 Val Trp Pro Ser Ser Pro Val Pro Glu Glu Ile Pro Arg Met His Pro
 165 170 175
 Gly Arg Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro Leu Arg Glu Lys Met
 180 185 190
 Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg

195

200

<210> 6

5 <211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

10 <400> 6

ES 2 441 210 T3

Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
 20 25 30
 Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
 50 55 60
 Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
 65 70 75 80
 Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
 85 90 95
 Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
 100 105 110
 Cys Arg His Ser Pro Gly Arg Gln Ser Pro Asp Met Pro Gly Asp Phe
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ala Pro Ser Phe Leu Pro Pro Arg Arg Ser Leu Pro Met
 130 135 140
 Leu Phe Arg Met Glu Trp Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ser Gln Ser Ala
 145 150 155 160
 Val Trp Pro Ser Ser Pro Val Pro Glu Glu Ile Pro Arg Met His Pro
 165 170 175
 Gly Arg Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro Leu Arg Glu Lys Met
 180 185 190
 Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu
 195 200 205
 Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg
 210 215 220

Arg
 225

<210> 7

5 <211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

10 <400> 7

Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu
 1 5 10 15

Val Trp Gly Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val
 20 25 30

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 8

Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr
 1 5

10 <210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptidos

<400> 9

Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val
 1 5 10

<210> 10

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 10

Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Lys
 1 5 10

25 <210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

5 <400> 11

Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr
 1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 12

Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr Lys
 1 5 10

15 <210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptidos

<400> 13

Glu Val Val Pro Phe
 1 5

<210> 14

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 14

Val Val Pro Phe Gln
1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 15

Val Pro Phe Gln Glu
1 5

10 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptidos

<400> 16

Pro Phe Gln Glu Val
1 5

<210> 17

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 17

Phe Gln Glu Val Trp
1 5

25 <210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

5 <400> 18

Gln Glu Val Trp Gly
1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 19

Glu Val Trp Gly Arg
1 5

15 <210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptidos

<400> 20

Val Trp Gly Arg Ser
1 5

<210> 21

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 21

Trp Gly Arg Ser Tyr
1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 22

Gly Arg Ser Tyr Cys
1 5

10 <210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptidos

<400> 23

Arg Ser Tyr Cys Arg
1 5

<210> 24

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 24

25 Ser Tyr Cys Arg Ala
1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 25

5 Tyr Cys Arg Ala Leu
 1 5

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptidos

<400> 26

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
1 5 10 15

Val Glu Thr

<210> 27

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

20 <400> 27

Gly Asp Glu Asn Leu
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 28

Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His
1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 29

Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Lys
1 5 10

10 <210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptidos

<400> 30

Gly Cys Cys Gly Asp
1 5

<210> 31

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 31

25 Cys Cys Gly Asp Glu
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 32

Cys Gly Asp Glu Asn
1 5

5 <210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptidos

<400> 33

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
1 5 10 15

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His
20 25

<210> 34

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 34

20 Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr
1 5 10

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptidos

<400> 35

Gln Leu Leu Lys Ile
1 5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 36

Arg Pro Ser Tyr Val
1 5

10 <210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptidos

<400> 37

Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr
1 5 10

<210> 38

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 38

25 Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Lys
1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 39

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln
1 5

5 <210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptidos

<400> 40

Val Glu Thr Ala Asn
1 5

<210> 41

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 41

20 Thr Ala Asn Val Thr
1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptidos

<400> 42

Asn Val Thr Met Gln
1 5

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptidos

<400> 43

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

<210> 44

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 44

15 Val Pro Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Lys
1 5 10

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptidos

<400> 45

Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys
1 5 10 15

Met Lys Pro Glu
20

<210> 46

25 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 46

Glu Cys Arg Pro
1

5 <210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptidos

<400> 47

Pro Leu Arg Glu Lys
1 5

<210> 48

<211> 36

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 48

Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys
1 5 10 15

Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu Cys Gly Asp
20 25 30

20 **Ala Val Pro Arg**
35

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptidos

<400> 49

Met Lys Pro Glu Arg
1 5

<210> 50

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 50

10 Lys Pro Glu Arg Arg
1 5

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptidos

<400> 51

Leu Cys Gly Asp Ala
1 5

<210> 52

20 <211> 86

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

25 <400> 52

ES 2 441 210 T3

His Val Arg Cys Glu Cys Arg His Ser Pro Gly Arg Gln Ser Pro Asp
1 5 10 15
Met Pro Gly Asp Phe Arg Ala Asp Ala Pro Ser Phe Leu Pro Pro Arg
20 25 30
Arg Ser Leu Pro Met Leu Phe Arg Met Glu Trp Gly Cys Ala Leu Thr
35 40 45
Gly Ser Gln Ser Ala Val Trp Pro Ser Ser Pro Val Pro Glu Glu Ile
50 55 60
Pro Arg Met His Pro Gly Arg Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro
65 70 75 80
Leu Arg Glu Lys Met Lys
85

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 53

Cys Glu Cys Arg His
1 5

10 <210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptidos

<400> 54

Glu Cys Arg His Ser
1 5

<210> 55

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 55

Lys Pro Leu Arg Glu
1 5

<210> 56

5 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

10 <400> 56

Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro
1 5 10 15

Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly
20 25

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos

<400> 57

Gln Gln Arg Lys Pro
1 5

20 <210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> oligopéptidos

<400> 58

Gln Arg Lys Pro Leu
1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptidos

<400> 59

Arg Lys Pro Leu Arg
1 5

<210> 60

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> oligopéptidos

15 <400> 60

Pro Glu Arg Arg Arg
1 5

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> oligopéptidos

<400> 61

Glu Arg Arg Arg Pro
1 5

25 <210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> oligopéptidos

<400> 62

Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro
1 5 10

5 <210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> oligopéptido

<400> 63

Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Péptido inmunológicamente activo, el cual posee la secuencia de información en una isoforma P/GF primaria, consistente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

IAN 1: SAGNGSSEVE VVPFQEVWGR SYCRALERLV

5 IAN 3: VETANVTMQL LKIRSGDRP SYVELTFSQH

o en una parte de los péptidos IAN 1 o IAN 3, donde la parte contiene por lo menos una de las secuencias de aminoácidos

WPFQEVWGRSY (IAN: 1-1-2) o RSGDRPSYVELT (IAN: 3-3-1).

10 2. Anticuerpo monoclonal 05-81-05, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-81-05, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2764.

3. Anticuerpo monoclonal 05-81-010, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-81-010, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2765.

4. Anticuerpo monoclonal 05-64/026, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-64/026, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2766.

15 5. Anticuerpo monoclonal 05-54/04, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-54/04, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2769.

6. Anticuerpo monoclonal 05-164/054, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-164/054, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2770.

20 7. Anticuerpo monoclonal 05-164/042, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-164/042, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2771.

8. Anticuerpo monoclonal 05-164/038, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-164/038, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2772.

9. Anticuerpo monoclonal 05-164/012, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-164/012, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2773.

25 10. Anticuerpo monoclonal 05-121/06, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-121/06, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2774.

11. Anticuerpo monoclonal 05-120/03, el cual es producido de la línea de células con la denominación 2005-120/03, el cual había sido depositado en el DSMZ bajo el número de ingreso DSM ACC2775.

30 12. Anticuerpo específico que compite para unirse al P/GF libre con uno o varios de los anticuerpos monoclonales según una o varias de las reivindicaciones 2, 3 y 6 a 11.

13. Anticuerpo específico que está unido a un epítoto, presente en la siguiente secuencia de aminoácidos RSGDRPSYVELT.

14. Anticuerpo específico que está unido a un epítoto, presente en la siguiente secuencia de aminoácidos: VVPFQEVWGRSY.

35 15. Péptidos según la reivindicación 1 para empleo como antígeno de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de P/GF.

16. Inmunoensayo para la detección de P/GF en una muestra, **caracterizado porque** un anticuerpo específico según una o varias de las reivindicaciones 2 a 14 es puesto en contacto con una muestra y se determina de manera cualitativa o cuantitativa la formación de un inmunocomplejo con participación del P/GF.

40 17. Equipo de prueba para la ejecución de un inmunoensayo según la reivindicación 16 que contiene un anticuerpo específico según una o varias de las reivindicaciones 2 a 14.