

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 083**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/36** (2006.01)

**C12N 9/74** (2006.01)

**C07K 16/42** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009** **E 09011791 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 2168985**

54 Título: **Anticuerpos para determinar el fragmento de protrombina F2/F1+2 en un inmunoensayo homogéneo**

30 Prioridad:

**30.09.2008 DE 102008049601**

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

**14.10.2014**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GMBH (100.0%)  
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76  
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**ALTHAUS, HARALD;  
BARTEN, ROLAND;  
EHM, MATTHIAS;  
FISCHER, BODO y  
TEIGELKAMP, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 507 083 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para determinar el fragmento de protrombina F2/F1+2 en un inmunoensayo homogéneo

La presente invención se encuentra en el campo del diagnóstico de coagulación y se refiere a anticuerpos que se enlazan específicamente a un complejo de F2/F1+2 y a un ligando específico F2/F1+2, así como a su preparación y a su uso en métodos para determinar F2/F1+2.

Para la evaluación clínica del estado del sistema de coagulación de la sangre de un paciente se encuentra disponible un gran número de parámetros relevantes para el diagnóstico. Principalmente, la detección cuantitativa de los llamados marcadores de activación de la coagulación hace imposible evaluar el proceso de coagulación o de fibrinólisis. La determinación del fragmento de protrombina F2/F1+2 en una muestra de un paciente hace posible la detección o el descarte de una formación de trombina incrementada in vivo y se emplea por ejemplo para revelar la formación de trombina intravascular en el caso de una coagulopatía por consumo, en tromboembolias venosas agudas o en el caso de oclusiones arteriales de vasos (infarto de miocardio, infarto cerebral) o para monitorear terapias anticoagulantes.

Protrombina es la proenzima de trombina, la enzima central de la cascada de coagulación de la sangre. La proteína protrombina tiene una estructura modular y consiste en una porción F1+2 N-terminal y una porción de trombina C-terminal. La protrombina se disocia mediante la actividad proteolítica del factor Xa de modo que por cada molécula de protrombina (70 kD) se genera una molécula de trombina (30 kD) y se libera un fragmento de protrombina F1+2 (35-37 kD). Mediante la disociación autocatalítica de protrombina por trombina puede llegarse además a la disociación de los fragmentos F1 (23 kDa) y F2 (14 kDa). Puesto que la trombina no existe en forma libre en la sangre pero está directamente enlazada a inhibidores y la fibrina, el alcance de la formación de la trombina tiene que comprenderse indirectamente, por ejemplo determinando los marcadores de activación F1+2 y/o F2. Una posibilidad para detectar o descartar una formación incrementada de trombina in vivo es, por consiguiente, la determinación de la concentración de F2/F1+2 en el plasma.

En general, en los ensayos de F2/F1+2 surge la dificultad de que la protrombina se presenta en la muestra en un exceso molar de 1000 a 10000 veces en comparación con F2/F1+2. La detección inmunológica de F2/F1+2 en presencia de protrombina se ve obstaculizada por el hecho de que los fragmentos F2/F1+2 liberados de protrombina tienen, en comparación con la protrombina intacta, no disociada, solamente un epítipo antigénico único específico para F2/F1+2, concretamente el terminal carboxilo del péptido F2/F1+2 (neoepítipo) producido mediante la disociación de trombina. Sólo los anticuerpos dirigidos contra la región carboxi-terminal del péptido F2/F1+2 son capaces de enlazarse específicamente a los fragmentos de protrombina F2/F1+2 sin mostrar al mismo tiempo una especificidad por la protrombina intacta. Todos los otros determinantes antigénicos del fragmento F2/F1+2 son asimismo específicos para protrombina intacta.

La preparación de anticuerpos F2/F1+2 específicos que no se enlazan a la protrombina se describe, por ejemplo, en la EP 303 983 A2 (Pelzer et al.), en US 5,830,681 (Hursting et al.) o en US 2003/0219845 A1 (Ruiz et al.). Para la especificidad de los anticuerpos anti-F2/F1+2 es importante que se enlacen a un epítipo que contiene al menos los cuatro aminoácidos con terminal carboxilo de los fragmentos 2/F1+2 (Ile-Glu-Gly-Arg-OH). Puesto que por lo regular para determinar la concentración de F2/F1+2 se emplean inmunoensayos de sándwich, se necesitan dos anticuerpos anti-F2/F1+2. En EP 1 541 676 A1 (Teigelkamp et al.) se describen anticuerpos que se enlazan a un epítipo sobre la mitad N-terminal del fragmento F2 y con esto también a la protrombina intacta, aunque son particularmente adecuados para usar como anticuerpos secundarios en combinación con anticuerpos primarios específicos para neoepítipo en un inmunoensayo de sándwich.

Los anticuerpos son adecuados para determinar la concentración de F2/F1+2 en muestras de plasma en inmunoensayos heterogéneos, preferiblemente en forma de un método ELISA de sándwich. Para este propósito los anticuerpos neoepítipo-específicos para F2/F1+2 ("anticuerpos primarios") se acoplan a una fase sólida y se incuban con la muestra de modo que los péptidos de F2/F1+2 son capaces de enlazarse a los anticuerpos inmovilizados. Mediante un paso de lavado se retiran las proteínas no enlazadas, principalmente protrombina, antes de aplicar el segundo anticuerpo ("anticuerpo secundario") que se enlaza a F2/F1+2 y a protrombina adicionando una solución de anticuerpos. Éste segundo anticuerpo ordinariamente se asocia con un componente generador de señal, que permite cuantificar la concentración de F2/F1+2.

Sin embargo, establecer un inmunoensayo de sándwich homogéneo sin pasos de lavado o de separación es solamente posible de una manera restringida a partir del estado de la técnica de los anticuerpos monoclonales conocidos, puesto que el anticuerpo secundario que se enlaza a F2/F1+2 y a protrombina en la estructura del ensayo homogéneo se enlaza en gran parte por la protrombina contenida en la muestra y de esta manera ya no se encuentra disponible para la formación de sándwich con el analito F2/F1+2, el cual es indispensable para generación de señal.

Por lo tanto, la presente invención se basó en el objetivo de proporcionar medios que hicieran posible determinar F2/F1+2 en muestras que contuvieran protrombina en exceso, específicamente en un ensayo de enlazamiento homogéneo.

El objetivo se logró proporcionando medios y procesos de acuerdo con la invención descritos en las reivindicaciones.

5 Principalmente el objetivo se logró proporcionando un anticuerpo monoclonal que se enlaza de modo específico a un complejo inmune que contiene un fragmento de protrombina F2/F1+2, al cual está enlazado un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con especificidad por el neoepítipo carboxi-terminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 y en cuyo caso el anticuerpo, sin embargo, no se enlaza al fragmento de protrombina F1+2 o F2 sólo y no se enlaza al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo con especificidad por el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 sólo.

10 Teóricamente se conocen anticuerpos con especificidad por inmunocomplejos que se componen de un analito al cual se enlaza un ligando específico para el analito, por ejemplo un anticuerpo primario o un fragmento de anticuerpo primario, por ejemplo de EP 264 219 A2, EP 475 784 A1, WO 85/04422 A1 o WO 87/07147. Sin embargo, en relación a la presente invención, se estableció de manera sorprendente que a fin de obtener un anticuerpo de acuerdo con la invención con especificidad para un inmunocomplejo de ligando de fragmento de protrombina F2/F1+2, tiene que usarse un inmunocomplejo como antígeno inmunizante que contiene un péptido, que comprende al menos el fragmento de protrombina completo F2 al cual se enlaza un fragmento de anticuerpo con especificidad por el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2. Con inmunocomplejos que solamente contenían un fragmento del fragmento de protrombina F2, así como con inmunocomplejos que solamente contenían un anticuerpo completo con especificidad para el neoepítipo del fragmento de protrombina F2/F1+2, no podían generarse anticuerpos con especificidad para el inmunocomplejo.

15 Es objeto de la presente invención un inmunocomplejo aislado, purificado, que contiene un péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo a cuyo terminal carboxi se enlaza un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, el cual contiene al menos los cuatro aminoácidos carboxiterminales Ile-Glu-Gly-Arg-OH y en cuyo caso el inmunocomplejo se acopla con una proteína portadora inmuno-estimuladora.

20 Un péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo, es decir los residuos de aminoácido 156-273 de la protrombina humana (véase, por ejemplo, Fig. 1 en Walz, D.A. (1977) Amino acid sequence of human prothrombin fragments 1 and 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 5, 1969-1972), y el cual tiene el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, puede obtenerse, por ejemplo mediante incubación de una solución que contiene protrombina con el factor Xa o mediante activación de la cascada de coagulación en una solución que contiene factor de coagulación, por ejemplo con el veneno de serpiente Russell's Viper Venom (RW), y purificación cromatográfica subsiguiente del fragmento F2. De modo alternativo, el fragmento de protrombina F2 puede obtenerse sintéticamente mediante síntesis química o de modo recombinante mediante expresión en un sistema de expresión procariota o eucariota.

25 Son adecuados todos los péptidos que comprenden al menos el fragmento de protrombina F2 completo inclusive el neoepítipo carboxiterminal, es decir incluso el fragmento de protrombina F1+2 completo y los diferentes fragmentos F1+2 truncados en los terminales amino.

30 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo adecuados con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, como por ejemplo fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv, de manera recombinante, por ejemplo, o mediante disociación enzimática de anticuerpos, preferentemente de anticuerpos monoclonales, en cuyo caso los anticuerpos son específicos para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 y no se enlazan a la protrombina. Anticuerpos específicos para F2/F1+2 de este tipo, que no se enlazan a la protrombina, se describen, por ejemplo, en EP 303 983 A2 (Pelzer et al.), en US 5,830,681 (Hursting et al.) o en US 2003/0219845 A1 (Ruiz et al.). La disociación enzimática de anticuerpos monoclonales puede realizarse, por ejemplo, mediante papaína, pepsina o ficina. Fragmentos de anticuerpos particularmente preferidos son fragmentos Fab, que pueden obtenerse, por ejemplo, por medio de disociación enzimática con papaína.

35 Fragmento de anticuerpos muy particularmente preferidos son fragmentos, principalmente fragmentos Fab, del anticuerpo monoclonal específico para neoepítipo F2/F1+2 96-163/04, el cual fue preparado de acuerdo con las enseñanzas de US 5,830,681 (Hursting et al., principalmente ejemplos I-VI) usando un péptido sintético de la secuencia Cys-Gly-Ser-Asp-Arg-Ala-Ile-Glu-Gly-Arg-OH ("PF2") como antígeno de inmunización y el cual se produce por una línea celular de hibridoma que fue depositada el 3 de junio de 2008 en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen y Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares), calle Inhoffenstraße 7B, 38124 Brunswick, Alemania, bajo el número de acceso DSM ACC2911.

5 Para la preparación del inmunocomplejo de la invención, se mezclaron juntos el péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo y el fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 para formar el inmunocomplejo y se incubaron en condiciones adecuadas. A continuación, el inmunocomplejo se separó de los demás reactivos, es decir se aisló y se purificó preferiblemente mediante cromatografía.

En una forma de realización preferida del inmunocomplejo de la invención, el complejo se reticula químicamente, preferiblemente mediante tratamiento del complejo con un aldehído tal como, por ejemplo, glutaraldehído o formaldehído.

10 Además, el inmunocomplejo se acopla a una proteína portadora tal como, por ejemplo, hemocianina de lapa (Keyhole Limpet) u ovalbumina. La acción inmunoestimulante de tales proteínas portadoras y los métodos para su acoplamiento se conocen en el estado de la técnica.

15 Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un inmunocomplejo de acuerdo con la invención como antígeno de inmunización en un método para obtener anticuerpos monoclonales que enlazan el complejo de manera específica, pero no los componentes individuales del complejo. Los métodos para obtener anticuerpos monoclonales son suficientemente conocidos tales como, por ejemplo, el establecimiento de células de hibridoma con purificación subsiguiente de los anticuerpos secretados.

20 La invención se refiere también a anticuerpos monoclonales que se caracterizan porque se enlazan a un inmunocomplejo que contiene un péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo al cual está enlazado un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, pero no al fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 solo.

Anticuerpos particularmente preferidos en el contexto de la presente invención son anticuerpos que se enlazan específicamente a un inmunocomplejo que contiene el péptido F2 completo al cual está enlazado un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal el cual se forma por la línea celular de hibridoma DSM ACC 2911.

25 Anticuerpos de este tipo se producen, por ejemplo, por las líneas celulares de hibridoma 2006-175/024, 2006-188/044 o 2006-188/069. Estas líneas celulares de hibridoma fueron depositadas el 3 de junio de 2008 en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen y Zellkulturen GmbH, (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) calle Inhoffenstraße 7B, 38124 Brunswick, Alemania, bajo los números de acceso DSM ACC2912, DSM ACC2913 y DSM ACC2914.

30 Objeto de esta invención también es un anticuerpo de acuerdo con la invención, el cual está asociado con una fase sólida y/o un componente de un sistema formador de señal.

35 El término "fase sólida" en el contexto de este invención incluye un objeto compuesto de material poroso y/o no poroso, por lo regular hidrófilo y que puede presentar las formas más diversas tales como, por ejemplo, un recipiente, un tubo, placas de microtitulación, una esfera, micropartículas, varillas, tiras, papel de filtro o de cromatografía, etcétera. Por lo regular, la superficie de la fase sólida es hidrofílica o se hace hidrofílica. La fase sólida puede componerse de los materiales más diversos tales como, por ejemplo, de materiales inorgánicos y/o de materiales orgánicos, de materiales sintéticos, de materiales de procedencia natural y/o materiales modificados de procedencia natural. Ejemplos de materiales de fase sólida son polímeros como, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli (cloruro de vinilo), poliacrilamida, moléculas de dextrano reticuladas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nailon; cerámica, vidrio, metales, principalmente metales nobles como oro y plata; magnetita, mezclas o combinaciones de los mismos, etcétera.

45 La fase sólida puede presentar un recubrimiento de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, carbohidratos, sustancias lipofílicas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de los mismos, por ejemplo a fin de reprimir o impedir el enlazamiento no específico de componentes de la muestra, o, por ejemplo, a fin de lograr mejoramiento respecto de la estabilidad de la suspensión de fases sólidas forma de partículas, de la estabilidad durante el almacenamiento, de la estabilidad dimensional o de la resistencia frente a la luz-ultravioleta, microbios u otros agentes con efecto dañino.

50 Un "sistema formador de señal" puede comprender uno o más componentes, en cuyo caso al menos un componente comprende una etiqueta detectable. Una etiqueta significa cualquier molécula que produce por sí misma una señal o puede inducir la producción de una señal tal como, por ejemplo, una sustancia fluorescente, una sustancia radioactiva, una enzima, una sustancia quimioluminiscente. La señal puede detectarse o medirse, por ejemplo, con base en la actividad enzimática, la luminiscencia, la absorción de luz, la dispersión de luz, la radiación electromagnética o radioactiva emitida o una reacción química.

Una etiqueta es capaz de generar por sí misma una señal detectable de modo que no son necesarios otros componentes. Muchas moléculas orgánicas absorben la radiación ultravioleta y la luz visible y la energía transferida por la absorción de la luz puede poner estas moléculas en un estado de energía excitado y emiten la energía absorbida en forma de luz de una longitud de onda diferente de aquella de la luz incidente. Otras etiquetas a su vez son capaces de generar directamente una señal detectable tal como, por ejemplo, isótopos radioactivos o tinturas.

Otras etiquetas a su vez requieren otros componentes para generar la señal, es decir que el sistema productor de señal incluye en tal caso todos los componentes requeridos para generación de señal tales como, por ejemplo, sustratos, coenzimas, extintores (quencher), acelerantes, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, iones, etc.

Etiquetas adecuadas son, por ejemplo, enzimas que incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, ureasa y acetilcolina esterasa; tintes; sustancias fluorescentes que incluyen fluoresceína isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, bromuro de etidio, cloruro de 5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonilo y quelatos fluorescentes de tierras raras; sustancias quimioluminiscentes que incluyen luminol, isoluminol, compuestos de acridinio, olefina, éter de enol, enamina, éter de arilvinilo, dioxeno, arilimidazol, lucigenina, luciferina y aequorina; sensibilizantes que incluyen eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, porfirina, ftalocianina, clorofila, Rosa bengala; coenzima; sustratos de enzima; isótopos radioactivos que incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Co}$  y  $^{75}\text{Se}$ ; partículas que incluyen partículas magnéticas o partículas, preferiblemente partículas de látex las cuales pueden ser marcadas ellas mismas, por ejemplo, con tintes, sensibilizantes, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, isótopos u otras etiquetas detectables; partículas de sol que incluyen soles de oro o plata, etc.

Un sistema formador de señal también puede incluir componentes que son capaces de entrar en una interacción detectable cuando están espacialmente cercanos entre sí, por ejemplo en forma de donantes de energía o recipientes de energía tales como, por ejemplo, fotos sensibilizantes y sustancias quimioluminiscentes (véase, por ejemplo, EP 515 194 A2), foto-sensibilizantes y fluoroforos (WO 95/06877), yodo-125 radioactivo y fluoroforos (Udenfriend, S. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8672-8676), fluoroforos y fluoroforos (Mathis, G. (1993) Clin. Chem. 39: 1953-1959) o fluoroforos y extintores de fluorescencia (US 3,996,345). Una interacción entre los componentes incluye la transferencia directa de energía entre los componentes, por ejemplo por emisión de luz o de electrones o por medio de moléculas químicas reactivas de corta vida. Aquí también están incluidos procesos en los que la actividad de un componente se inhibe o se refuerza por uno u otros varios, por ejemplo inhibiendo o aumentando la actividad enzimática o inhibiendo, incrementando o modificando (por ejemplo, desplazamiento de la longitud de onda, polarización) la radiación electromagnética emitida por el componente influenciado. La interacción entre los componentes también incluye cascadas de enzimas. En este caso los componentes son enzimas, al menos una de las cuales proporciona el sustrato para otra de modo que resulte una velocidad de reacción máxima o mínima de la conversión del sustrato acoplado.

Una interacción eficiente entre los componentes usualmente tiene lugar cuando están espacialmente adyacentes, es decir por ejemplo dentro de un rango de distancia de unos pocos micrómetros, en particular dentro de un rango de distancia por debajo de 600 nanómetros, preferiblemente por debajo de 400 nm, muy particularmente preferible por debajo de 200 nm.

Frecuentemente se usan micropartículas como fase sólida y/o como etiqueta. El término "micropartículas" para los propósitos de esta invención significa partículas que tienen un diámetro aproximado de al menos 20 nm y no mayor a 20  $\mu\text{m}$ , normalmente entre 40 nm y 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 0.1 y 10  $\mu\text{m}$ , particularmente preferible entre 0.1 y 5  $\mu\text{m}$ , muy particularmente preferible entre 0.15 y 2  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas pueden tener formas regulares o irregulares. Pueden ser esferas, esferoides, esferas con cavidades o poros más o menos grandes. Las micropartículas pueden componerse de material orgánico, inorgánico o de una mezcla o combinación de ambos pueden componerse de un material poroso o no poroso, de un material que puede hincharse o puede no hincharse. Las micropartículas pueden tener teóricamente cualquier densidad pero se prefieren partículas que tienen una densidad cercana a la densidad del agua tal como aproximadamente 0.7 aproximadamente 1.5 g/ml. Las micropartículas preferidas son capaces de suspenderse en soluciones acuosas y son tan estables en suspensión como es posible. Pueden ser transparentes, parcialmente transparentes u opacas. Las micropartículas pueden consistir de una pluralidad de capas tales como, por ejemplo, las partículas llamadas partículas "core-and-shell" (de núcleo y coraza) con un núcleo y una o más capas de envoltura. El término micropartícula comprende, por ejemplo, cristales de tintes, soles de metal, partículas de sílice, partículas de vidrio, partículas magnéticas, partículas poliméricas, gotas de aceite, partículas de lípido, dextrano y agregados de proteína. Micropartículas preferidas son partículas que pueden suspenderse en soluciones acuosas y se componen de material polimérico hidroinsoluble, en particular de polietilenos sustituidos. Muy particularmente se prefieren partículas de látex, por ejemplo, compuestas de poliestireno, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ácido metacrílico, polímeros de acrilonitrilo, acrilonitrilo-butadieno-estireno, poli (acetato de vinilo)-acrilato, polivinilpiridina, cloruro de vinilo-acrilato. Son de particular interés las partículas de látex que tienen grupos reactivos en su superficie, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo, amino o aldehído que permiten un enlace covalente, por ejemplo de asociados específicos de enlazamiento a las partículas

de látex. La preparación de partículas de látex se describe, por ejemplo, en EP 80 614 A2, EP 227 054 A2 y EP 246 446 A2.

El término "asociado" tiene un amplio significado e incluye, por ejemplo, enlace covalente, no covalente, enlace indirecto y directo, adsorción sobre una superficie y la inclusión en una depresión o pozo, etc. En el caso de un enlace covalente, los anticuerpos se enlazan por medio de un enlace químico a la fase sólida o a un componente de un sistema generador de señal. Ejemplos de un enlace no covalente son adsorción de superficie, inclusión en cavidades o enlace de dos ligandos específicos. Además de un enlace directo a la fase sólida cual componente de un sistema generador de señal, es posible que los anticuerpos se enlacen también indirectamente a la fase sólida cual etiqueta por medio de una interacción específica con otros ligandos específicos (véase, por ejemplo, EP 411 945 A2). Esto ha de ilustrarse en detalle por medio de ejemplos: el anticuerpo biotinilado puede enlazarse a la etiqueta por medio de avidina enlazada etiqueta; un conjugado de fluoresceína-anticuerpo puede enlazarse a la fase sólida por medio de anticuerpos anti-fluoresceína enlazados a fase sólida; o el anticuerpo puede enlazarse a la fase sólida o la etiqueta por medio de proteínas que enlazan inmunoglobulina.

Los anticuerpos de la invención son adecuados para usarse en métodos para la determinación cuantitativa o cualitativa del fragmento de protrombina F2/F1+2 en una muestra biológica de un sujeto, preferiblemente en una muestra de sangre o plasma de un paciente. Otro objeto de la presente invención es, por lo tanto, un método para determinar el fragmento de protrombina F2/F1+2 en una muestra, en cuyo caso la muestra se pone en contacto con un fragmento de anticuerpo que tiene especificidad para el neopéptido carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 contenido en la muestra. Además, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo de la invención, o con un fragmento del mismo, el cual se enlaza al inmunocomplejo pero no al fragmento de protrombina F2/F1+2 solo y no al fragmento de anticuerpo con especificidad para el neopéptido carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 solo, y se determina la cantidad del inmunocomplejo enlazado. En una modalidad preferida la muestra se pone en contacto con un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o Fab del anticuerpo el cual se forma por la línea celular de hibridoma depositada DSM ACC2911, para formar un inmunocomplejo con el fragmento de protrombina F2/F1+2 contenido en la muestra, y se determina la cantidad del inmunocomplejo con ayuda de un anticuerpo que tiene especificidad para este inmunocomplejo, preferiblemente con ayuda de un anticuerpo que se forma por una de las líneas celulares de hibridoma depositadas DSM ACC2912, DSM ACC2913 o DSM ACC2914 o de un fragmento de las mismas.

En un método para la determinación cuantitativa de F2/F1+2 se mide la cantidad o la concentración de F2/F1+2 en la muestra. El término "detección cuantitativa" también incluye métodos semicuantitativos que sólo consideran la cantidad o concentración aproximadas de F2/F1+2 en la muestra o pueden servir solamente para indicar una cantidad o concentración relativa. Por una detección cualitativa ha de entenderse simplemente la detección de la presencia de F2/F1+2 en la muestra con la indicación de que la concentración de F2/F1+2 en la muestra está por debajo o por arriba de un determinado valor o varios determinados valores umbrales.

De esta manera, la invención también se refiere a métodos para la detección cuantitativa o cualitativa de F2/F1+2 en una muestra y a reactivos adecuados para estos. Estos métodos pueden ser los llamados ensayos heterogéneos u homogéneos de enlazamiento en los cuales pueden sacarse conclusiones acerca de la presencia, ausencia o cantidad de F2/F1+2 en una muestra mediante un enlazamiento específico de F2/F1+2 a un ligando. Los inmunoensayos son ejemplos de ensayos de enlazamiento.

Los llamados "ensayos heterogéneos de enlazamiento" se caracterizan por uno o más pasos de separación y/o de lavado. La separación puede tener lugar, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación, precipitación con sustancias tales como polietilenglicol o sulfato de amonio, filtración, remoción magnética, adhesión a una fase sólida. Una tal "fase sólida" se compone de material poroso y/o no poroso, usualmente hidrófilo. Puede presentar las formas más diversas tales como, por ejemplo, envase, tubo, placa de microtitulación, esfera, micropartículas, varillas, tira, papel de filtro o de cromatografía, etc. en ensayos heterogéneos de enlazamiento en formato sándwich, usualmente uno de los ligandos específicos para F2/F1+2 se enlaza a una fase sólida y sirve para retirar el complejo de enlazamiento "F2/F1+2 - ligando específico para F2/F1+2" de la fase líquida, mientras que el otro ligando específico para el analito tiene una etiqueta detectables (por ejemplo, una enzima, una etiqueta fluorescente o quimioluminiscente, etc.) para detectar el complejo de enlazamiento. Estos métodos de ensayo se dividen además en los llamados ensayos de sándwich de un paso en los cuales los dos asociados específicos de enlazamiento se incuban simultáneamente con la muestra, y en ensayos de sándwich de dos pasos en los cuales la muestra se incubaba primero con el reactivo de fase sólida y después de un paso de separación y lavado y el complejo de enlazamiento enlazado a fase sólida compuesto de F2/F1+2 y ligando específico para F2/F1+2 se incubaba con el reactivo de detección.

En los "ensayos homogéneos de enlazamiento" no se efectúa una separación entre componentes libres y enlazados al complejo de "F2/F1+2 - ligando específico para F2/F1+2" del sistema formador de señal. La mezcla de ensayo que contiene los ligandos específicos para F2/F1+2, los componentes formadores de señal y la muestra, se mide después o incluso durante la reacción de enlace sin otro paso de separación y/o lavado y se determina la correspondiente señal medida. Ejemplos de inmunoensayos homogéneos son muchos métodos turbidimétricos y nefelométricos, en cuyo caso los ligandos específicos para analito, usados para la detección, pueden asociarse con

partículas de látex; ensayos EMIT®; ensayos CEDIA®; inmunoensayos de fluorescencia-polarización; inmunoensayos de canalización de oxígeno luminiscentes (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassays o "LOCI", véase EP 515 194 A2; Ullman, E. F. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5426-5430; Ullman, E. F. et al. (1996) Clinical Chemistry ,42: 1518-1526), etc. en un inmunoensayo de sándwich homogéneo, tal como, por ejemplo, un ensayo de látex nefelométrico, los reactivos de anticuerpo se incuban juntos con la muestra y se mide la señal durante y/o después de la incubación sin llevar a cabo un paso de separación o lavado antes de la medición. En otras palabras: no hay separación de analito enlazado a anticuerpo del analito libre o de anticuerpos que no hayan enlazado el analito.

Los ensayos homogéneos y heterogéneos de enlazamiento también pueden realizarse en forma de un, así llamado, "ensayo de sándwich". En este caso, por ejemplo en un ensayo heterogéneo de enlazamiento, el analito está enlazado por un ligando, específico para analito, asociado a fase sólida y por un ligando, específico para analito, el cual está asociado con un componente de un sistema formador de señal.

En un "ensayo de enlazamiento competitivo" homogéneo o heterogéneo compiten el analito de la muestra y el analito del reactivo (por ejemplo, un "analito modificado" tal como, por ejemplo, un fragmento de F2/F1+2 o un F2/F1+2 etiquetado marcado) por el enlace a un número limitado de ligandos específicos para analito. Ejemplos para ilustrar el principio: (i) el analito de la muestra compite con el analito del reactivo el cual está asociado con un componente de un sistema formador de señal, por el enlace a ligandos específicos para el analito, asociados a la fase sólida o (ii) el analito de la muestra compite con el analito asociado a la fase sólida (= analito de reactivo) por el enlace con ligandos específicos para analito que están asociados con un componente de un sistema formador de señal.

La detección de F2/F1+2 con los anticuerpos de la invención también puede efectuarse con métodos tales como, por ejemplo: Western Blot, Dot Blot, inmunolectroforesis, electroforesis por inmunofijación, electro inmunodifusión, inmunoprecipitación, inmunodifusión radial, inmunofijación, inmunocromatografía, aglutinación por látex, ensayo turbidimétrico o nefelométrico, ensayo homogéneo o heterogéneo de enlazamiento, ensayo de uno o de dos pasos, ensayo de sándwich, ensayo indirecto, ensayo competitivo, ensayos por "point-of-care" (punto de cuidado), etc. estos y otros métodos de detección se describen, por ejemplo, en "Labor und Diagnose", ed. L. Thomas, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1998, capítulo 60.

La expresión "ensayos por point-of-care" o "ensayos por POC" incluye ensayos en los que no se requiere un aparato analítico o de medición por separado para realizar el ensayo evaluar el ensayo. Los ensayos por POC se basan en muchos casos en métodos de inmunocromatografía, remoción inmunocompleja mediante técnicas de filtración y/o inmunofijación. Los ensayos por POC están destinados principalmente para mediciones en el sitio, por ejemplo en la cama de un hospital o en casa, para el médico de emergencias y/o en el caso del médico residente y menos para el laboratorio grande. Los ensayos por POC pueden realizarse principalmente también por personas que no tienen entrenamiento ni experiencia médica-técnica detallada en el área de medicina de laboratorio. El término "ensayos por POC" también significa para los propósitos de esta invención las llamadas pruebas caseras o pruebas OTC, que pueden llevarse a cabo por parte de personas profanas en medicina, por ejemplo las diferentes pruebas de embarazo comercializadas para uso doméstico. Otros ensayos por POC se refieren, por ejemplo, a la detección de marcadores de infarto de miocardio, drogas, medicamentos, marcadores de infección e inflamación. En muchos ensayos por POC, los ligandos específicos están asociados o se asocian en el transcurso de la realización del ensayo con o sobre tiras o discos de filtro o de cromatografía. Una reacción de detección positiva o negativa puede conectarse, por ejemplo, con la aparición o no aparición de una banda coloreada en un campo de prueba particular, y/o la aparición o no aparición de un símbolo particular, por ejemplo un "+", un "-" y/o la intensidad de la respectiva señal medida.

Un ensayo por POC para F2/F1+2 puede diseñarse, por ejemplo, tal como sigue: se aplican la muestra y los fragmentos de anticuerpo etiquetados con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 sobre una tira de ensayo. Ejemplos de etiquetas adecuadas son, por ejemplo, partículas de látex coloreadas, poro coloidal, enzimas, etc. Si F2/F1+2 está contenido en la muestra, se forman complejos de fragmento de anticuerpo F2/F1+2. Estos complejos se mueven, por ejemplo mediante fuerza capilar, hacia una zona en la que los anticuerpos de la invención son capaces de enlazarse específicamente al inmunocomplejo que contiene F2/F1+2 y el fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 están inmovilizados o se inmovilizan durante la realización del método de ensayo (por ejemplo mediante un puente de biotina-avidina), por ejemplo en forma de una banda. Los inmunocomplejos de anticuerpo-F2/F1+2 etiquetados se enlazan en este sector y forman un complejo de sándwich con los anticuerpos inmovilizados. La intensidad de la señal de etiqueta en este caso es proporcional a la concentración de muestra de F2/F1+2.

Otro objeto de acuerdo con la invención es un kit de ensayo que comprende al menos un reactivo que comprende un anticuerpo de la invención el cual se enlaza a un inmunocomplejo que comprende fragmento de protrombina F2, al cual está enlazado un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, pero no al fragmento de protrombina F2 solo y no al fragmento de anticuerpo con

especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 solo. Un kit de ensayo preferido comprende un anticuerpo que se forma por una de las líneas celulares de hibridoma depositadas DSM ACC2912, DSM ACC2913 o DSM ACC2914. En un kit de este tipo normalmente están contenidos todos o solamente algunos componentes de un ensayo en forma empacada. Los anticuerpos de la invención pueden asociarse, por ejemplo, con una o más fases sólidas y/o uno o más componentes de un sistema generador de señal. El kit de ensayo puede comprender, por ejemplo, estándares, controles y otros reactivos tales como, por ejemplo, amortiguadores (búferes), soluciones de lavado, soluciones que inducen señal de medición y/o sustratos de enzimas; cubetas; pipetas y/o instrucciones de ensayo.

Un kit de ensayo de la invención contiene preferiblemente además un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, preferiblemente un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal 96-163/04, que se forma por la línea celular de hibridoma depositada DSM ACC2911.

Figura 1

Curvas de calibración para cuantificar F2/F1+2 en un ensayo homogéneo LOCI® (véase ejemplo de realización 3). Las señales medidas muestran una relación proporcional con la concentración de F1+2 tanto en un primer diseño de ensayo en el cual los anticuerpos específicos del inmunocomplejo biotinilado (BA) se emplearon en combinación con el anticuerpo específico para neoepítipo F2/F1+2 (CB) acoplado con Chemibead (líneas continuas) como en un segundo ensayo diseñado en el cual se empleó un anticuerpo específico para neoepítipo (BA) de F2/F1+2 biotinilado en combinación con anticuerpos específicos para el inmunocomplejo (CB) acoplados con Chemibead (líneas discontinuas).

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben entenderse como restrictivos.

**Ejemplo 1:** Preparación de diversos inmunocomplejos para usar como antígenos de inmunización

Los siguientes inmunocomplejos se usaron como antígenos de inmunización:

TABLA 1

	Inmunocomplejo		Reticulación	Proteína soporte
	Fragmento de protrombina	Anticuerpo F2/F1+2 96-163/04		
a)	Péptido F2/F1+2 15mer	Completo	---	---
b)	Péptido F2/F1+2 15mer	Completo	Glutaraldehído	---
c)	Fragmento F2 completo	Completo	---	---
d)	Fragmento F2 completo	Completo	Glutaraldehído	---
e)	Fragmento F2 completo	Fragmento Fab	Glutaraldehído	KLH
f)	Fragmento F2 completo	Fragmento Fab	---	Ovalbumina

Materiales de partida:

Fragmentos de protrombina usados:

F2/F1+2-péptido 15mer

Péptido sintético que consiste de los residuos de aminoácido 14C-terminales del fragmento de protrombina humano F2/F1+2 y un residuo de cisteína amino-terminal adicional (secuencia: H-Cys-Leu-Asp-Glu-Asp-Ser-Asp-Glu-Glu-Arg-Ala-Ile-Glu-Gly-Arg-OH).

Fragmento F2 completo

Para obtener un fragmento F2 completo (14 kDa) se usó un concentrado de factor de coagulación comercialmente disponible (complejo de protrombina humano) como fuente de protrombina (Beriplex P/N 500, CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania). La preparación del preparado F2 se realizó de la siguiente manera:

1. Disolución de Beriplex en búfer de activación (10 mmol Tris, 10 mmol CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5),

2. Activación de coagulación usando RVV-sefarosa específica para FX (veneno de serpiente acoplada a material de soporte) e incubación revolviendo a 37 °C,

3. Separación del material de soporte por medio de un embudo de succión o centrifugación y detención subsiguiente de la actividad de coagulación por medio de PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) así como adición de citrato de sodio.
4. Doble adsorción/precipitación de los productos de disociación con dominios de Gla por medio de cloruro de bario y remoción mediante centrifugación,
5. Estabilización, filtración y concentración del sobrenadante,
6. Filtración con gel del sobrenadante por medio de Superdex™ 75 material de gel (GE Healthcare Europe GmbH, Alemania), búfer de corrida 50 mmol NaHPO<sub>4</sub>, pH 8,5, uso de las fracciones que contienen F2 para mayor purificación,
7. Cromatografía por intercambio iónico usando material de soporte Mono Q (GE Healthcare Europe GmbH, Alemania):
- Búfer A: 50 mmol NaHPO<sub>4</sub>, pH 8,5
- Búfer B: 50 mmol NaHPO<sub>4</sub> + 1 mol NaCl, pH 8,5
- Carga de las fracciones que contienen F2 en el búfer A, elución con gradiente de sal lineal (0-40 % de búfer B, 20 volúmenes de columna), recolección y acumulación de las fracciones que contienen F2,
8. Verificación de la pureza de la preparación mediante SDS-PAGE y Western-Blot.
- Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo usados:
- El anticuerpo monoclonal F1+2 96-163/04 con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 se preparó de acuerdo con las enseñanzas de US 5,830,681 (Hursting et al.). La línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo se depositó bajo el número de acceso DSM ACC2911. Para la preparación del fragmento Fab se disoció el anticuerpo F1+2 96-163/04 mediante métodos conocidos con papaína y el fragmento Fab se concentró.
- Preparación de los inmunocomplejos:
- Para preparar los inmunocomplejos, el péptido sintético F2/F1+2 (15mer) o el fragmento F2 completo purificado en un exceso de 10-30 molar se adicionó al anticuerpo monoclonal F1+2 96-163/04 o a su fragmento Fab, se incubó en búfer de PBS (pH 7,2) durante 3 a 3.5 horas a temperatura ambiente y a continuación el inmunocomplejo se purificó mediante cromatografía sobre Sephacryl™ S-100 (GE Healthcare Europe GmbH, Alemania).
- Reticulación de inmunocomplejos:
- A la mezcla se adicionó glutaraldehído en una concentración de 0,2 % y la mezcla se incubó durante dos horas 2-8 °C. La reacción se detuvo adicionando NaBH<sub>4</sub>, y el inmunocomplejo reticulado se purificó a través de una columna de desalinización HiPrep™ (GE Healthcare Europe GmbH, Alemania) (búfer de corrida PBS pH 7,2).
- Acoplamiento a proteínas de soporte:
- El acoplamiento de los inmunocomplejos o de los inmunocomplejos reticulados a la hemocianina de lapa (KLH por Keyhole Limpet Hemocyanin) u ovalbumina se realizó de acuerdo con métodos rutinarios conocidos.
- Ejemplo 2:** Preparación y privado de anticuerpos de la invención
- De acuerdo con el estado de la técnica, se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones BALB/c respectivamente con 20 µg de antígeno de inmunización (véanse inmunocomplejos del ejemplo 1). Se fusionaron células de bazo de los animales inmunizados con células de mieloma (Sp2/0), y se establecieron líneas celulares de hibridoma.
- Anticuerpos adecuados se identificaron tal como sigue:
- ELISA No. 1: Reactividad con el inmunocomplejo compuesto del fragmento F2 y del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo monoclonal F1+2-96-163/04

## ES 2 507 083 T3

Placas de microtitulación recubiertas con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo monoclonal F1+2 96-163/04 se incubaron con una solución que contenía fragmento F2 (véase Ejemplo 1) a fin de formar un inmunocomplejo del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo específico para F2/F1+2 y del fragmento F2.

ELISA No. 2: Reactividad con el fragmento F2 sólo

- 5 Se recubrieron placas de microtitulación con el fragmento F2 purificado (véase Ejemplo 1).

ELISA No. 3: Reactividad con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo monoclonal F1+2 96-163/04 solo

Se recubrieron placas de microtitulación con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo específico para F2/F1+2 96-163/04.

- 10 En cada pozo de las placas de microtitulación recubiertas se dosificaron con pipeta 100 µl de sobrenadante de cultivo celular (dilución 1:2) y se incubaron durante una hora a +15 hasta +25 °C. Después de haber lavado la placa dos veces con solución de lavado POD (OSEW; Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) se adicionaron con pipeta 100 µl de conjugado IgG anti ratón/Fc-POD (conjugado de peroxidasa, Sigma-Aldrich GmbH, Alemania, Prod. No. A0168) en cada pozo y se incubaron por una hora a +15 hasta +25 °C. Después de lavar dos veces más la placa, a cada pozo se adicionaron con pipeta 100 µl de solución de cromógeno TMB (solución de tetrametilbencidina, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) y jugaron por 15 otros 30 minutos a +15 hasta +25 °C. Después de la incubación a cada pozo se adicionaron 100 µl de solución de detención POD (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) y se evaluó la pipeta de microtitulación a 450 nm en el lector de absorbancia Tecan Sunrise™ Absorbance Reader (Tecan Alemania, GmbH, Crailsheim, Alemania).

- 20 Las líneas celulares cuyo sobrenadantes de cultivo celular mostraron una buena reactividad con el inmunocomplejo (ELISA No. 1) y una mínima reactividad hasta ninguna reactividad con los componentes individuales (ELISA Nos. 2 y 3), se clonaron y a partir de estos clones se purificaron cantidades mayores de anticuerpo. La concentración de los anticuerpos purificados se ajustó a 1 o 0,1 µg/mL y se ensayó en ELISAs Nos. 1 a 3.

Los resultados se muestran en las tablas 2 (concentración de anticuerpo de 1 µg/mL) y 3 (concentración de anticuerpo de 0,1 µg/mL). Los valores de la extinción a 450 nm se indican como datos medidos.

25

Tabla 2

MAK	Grupo No.	ELISA No. 1	ELISA No. 2	ELISA No. 3
2006-140/0651	1	3,961	0,038	0,511
2006-175/024	1	2,761	0,028	0,108
2006-188/044	1	3,906	0,027	0,186
2006-188/069	1	3,848	0,029	0,233
2006-188/086	1	3,918	0,036	0,174
2006-188/0143	1	3,970	0,031	0,387
2006-209/09	1	3,819	0,030	0,166
2006-216/04	1	1,940	0,024	0,230
Protr.195/097	2	4,103	3,570	0,135
96-163/04	3	0,923	1,921	0,112
95-332/03	3	0,290	3,552	0,097
CRP 268/094	4	0,062	0,027	0,099
Fondo	-	0,082	0,034	0,097

Tabla 3

MAK	Grupo No.	ELISA No. 1	ELISA No. 2	ELISA No. 3
2006-140/0651	1	3,645	0,025	0,135
2006-175/024	1	1,490	0,034	0,107
2006-188/044	1	3,808	0,034	0,099
2006-188/069	1	3,779	0,031	0,121
2006-188/086	1	3,835	0,024	0,107
2006-188/0143	1	3,795	0,025	0,132
2006-209/09	1	3,171	0,027	0,110
2006-216/04	1	1,548	0,020	0,102
Protr. 195/097	2	3,534	1,850	0,102
96-163/04	3	0,174	0,615	0,096
95-332/03	3	0,096	1,203	0,096
CRP 268/094	4	0,081	0,025	0,101
Fondo	-	0,082	0,034	0,097

Los anticuerpos monoclonales ensayados se dividieron en grupos para una mejor claridad:

Grupo 1: anticuerpos de la invención con especificidad para el inmunocomplejo compuesto de fragmento F2 y de fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo específico para el neoepítipo F2/F1+2 F1+2 96-163/04;

5 Grupo 2: anticuerpo específico para protrombina que se enlaza a un epítipo en la mitad N-terminal del fragmento F2 (véase EP 1 541 676 A1, ejemplo 2 d) y e), líneas celulares de hibridoma depositada bajo el número de acceso DSM ACC2607), introducido conjuntamente como control;

Grupo 3: anticuerpos monoclonales con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, preparado de acuerdo con la enseñanza en US 5,830,681 (Hursting et al.), introducidos conjuntamente como control;

10 Grupo 4: anticuerpo monoclonal extraño el sistema, introducido conjuntamente como control negativo.

Los anticuerpos de la invención del grupo 1 muestran las propiedades deseadas de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el inmunocomplejo, más específicamente una reactividad tan buena como es posible con el complejo en ELISA No. 1, y en ELISA Nos. 2 y 3 por lo contrario solamente reacción mínima o ninguna.

**Ejemplo 3:** Ensayo homogéneo LOCI® para cuantificar F2/F1+2

15 La tecnología LOCI® usada aquí se basa en un compuesto quimioluminiscente acoplado sobre partículas de látex (Chemibeads, CB) y un fotosensibilizador acoplado a partículas de látex (Sensibeads, SB) que se llevan a una proximidad espacial entre sí mediante enlazamiento a un analito, de modo que se genera oxígeno singlete, el cual se genera por el fotosensibilizador que puede excitar el compuesto quimioluminiscente. La cantidad de la luminiscencia generada se relaciona con la cantidad de analito. Usando la tecnología LOCI® se muestra una  
20 dependencia de señal de la concentración de F2/F1+2 en un diseño de ensayo inmunológico homogéneo.

Para un primer diseño de ensayo, los anticuerpos específicos para inmunocomplejo 2006-175/024 (de DSM ACC 2912), 2006-188/044 (de DSM ACC 2913) o 2006-188/069 (de DSM ACC 2914) se acoplaron a Chemibeads. Como segundo componente se emplearon Sensibeads recubiertos con estreptavidina. Como tercer componente se empleó el anticuerpo específico para inmunocomplejo F2/F1+2, biotinilado, 96-163/04 (de DSM ACC2911).

25 Para un diseño de ensayo secundario, se acopló el anticuerpo específico para neoepítipo F2/F1+2 96-163/04 (de DSM ACC2911) a Chemibeads. Como segundo componente se emplearon Sensibeads recubiertas con estreptavidina. Como tercer componente se emplearon los anticuerpos biotinilados, específicos para inmunocomplejo 2006-175/024 (de DSM ACC 2912), 2006-188/044 (de DSM ACC 2913) o 2006-188/069 (de DSM ACC 2914).

30 Para cuantificar la concentración de F2/F1+2 se mezcló una muestra de plasma con ambos reactivos (Chemibeads y anticuerpo biotinilado) y se incubó durante 220 segundos a 37 °C. Después se adicionaron las Sensibeads como otro componente de señal. Después de esto se efectuó una nueva incubación durante 360 segundos a 37 °C. A continuación se efectuó la medición de la quimioluminiscencia en el lector LOCI.

35 Para cuantificar la concentración de F2/F1+2 en muestras de plasma humana se construyó una curva estándar. Para este propósito se ajustó F1+2 en un búfer adecuado a una concentración definida de 5000 pmol/l. De esta solución madre se realizó una serie de diluciones y se analizó tal como fue descrito antes. El gráfico de la concentración de F1+2 (eje X) contra las alturas de señal medidas da lugar a una curva de calibración. Tal como puede verse de la figura 1, la señal generada en los dos diferentes diseños de ensayo es proporcional a la concentración de F1+2 en la muestra, lo cual hace posible cuantificar la concentración de F2/F1+2.

40 Otras investigaciones han mostrado que no se encontró un efecto de high-dose hook (falso negativo) hasta una concentración de 1600000 pmol/l de F1+2 con los diseños de ensayo seleccionados aquí. De esta manera casi se excluye una determinación incorrectamente baja del analito.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Inmunocomplejo aislado que contiene un péptido el cual comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo, en cuyo terminal carboxilo está enlazado un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, el cual contiene al menos los cuatro aminoácidos carboxiterminales Ile-Glu-Gly-Arg-OH, en cuyo caso el inmunocomplejo está acoplado a una proteína soporte inmunoestimulante.
2. Inmunocomplejo de acuerdo con la reivindicación 1, en cuyo caso el fragmento de anticuerpo enlazado es un fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv.
- 10 3. Inmunocomplejo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en cuyo caso el fragmento de anticuerpo enlazado es un fragmento de un anticuerpo monoclonal que se forma por la línea celular de hibridoma DSM ACC 2911.
4. Inmunocomplejo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, el cual está acoplado a la proteína soporte inmunoestimulante hemocianina de lapa (Keyhole Limpet Hemocyanin).
- 15 5. Inmunocomplejo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, el cual está reticulado por medio de un aldehído.
6. Uso de un inmunocomplejo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 como antígeno de inmunización en un método para producir un anticuerpo monoclonal.
- 20 7. Anticuerpo monoclonal caracterizado porque se enlaza a un inmunocomplejo, en cuyo caso el inmunocomplejo contiene un péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo y a cuyo terminal carboxilo se enlaza un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, el cual contiene al menos los cuatro aminoácidos carboxi terminales Ile-Glu-Gly-Arg-OH, en cuyo caso el anticuerpo monoclonal, sin embargo, no se enlaza al fragmento de protrombina F2 solo y no se enlaza al fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 solo.
- 25 8. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizado porque éste se produce por una de las líneas celulares de hibridoma DSM ACC2912, DSM ACC2913 o DSM ACC2914.
9. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 y 8 caracterizado porque se asocia con un componente de un sistema generador de señal.
- 30 10. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9 caracterizado porque se asocia con una fase sólida.
- 35 11. Uso de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10 o de un fragmento del mismo, el cual se enlaza a un inmunocomplejo, en cuyo caso el inmunocomplejo contiene un péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo y en cuyo terminal carboxilo está enlazado un fragmento del anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, el cual contiene los cuatro aminoácidos carboxiterminales Ile-Glu-Gly-Arg-OH, en cuyo caso el anticuerpo monoclonal, sin embargo, no se enlaza al fragmento de protrombina F2 solo y no se enlaza al fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 solo, en un método in vitro para detección cuantitativa o cualitativa de F2/F1+2.
12. Línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 7.
- 40 13. Línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 12, la cual está depositada en la DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2912, DSM ACC2913 o DSM ACC2914.
- 45 14. Reactivo que contiene un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10 o un fragmento del mismo, el cual se enlaza a un inmunocomplejo, en cuyo caso el inmunocomplejo contiene un péptido que comprende al menos el fragmento de protrombina F2 completo y en cuyo terminal carboxilo está enlazado un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2, el cual contiene al menos los cuatro aminoácidos carboxiterminales Ile-Glu-Gly-Arg-OH, en cuyo caso el anticuerpo monoclonal, sin embargo, no se enlaza al fragmento de protrombina F2 solo y no se enlaza al fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 solo.

15. Kit de ensayo que contiene un reactivo de acuerdo con la reivindicación 14.

5 16. Método para determinar el fragmento de protrombina F2/F1+2 en una muestra, en cuyo caso la muestra se pone en contacto con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con especificidad para el neoepítipo carboxiterminal del fragmento de protrombina F2/F1+2 para formar un inmunocomplejo con el fragmento de protrombina F2/F1+2 contenido en la muestra, caracterizado porque la muestra adicionalmente se pone en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7.

**Figura 1**

