

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 106**

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 11002653 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2399933**

54 Título: **Asociados de unión del factor de crecimiento placentario, en particular hacia el anticuerpo dirigido hacia el factor de crecimiento placentario, su producción y uso**

30 Prioridad:

09.05.2005 DE 102005022047

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

16.02.2015

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**ALTHAUS, HARALD;
TEIGELKAMP, STEFAN DR.;
TEIGELKAMP, SABINE DR. y
VITZTHUM, FRANK DR.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 529 106 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 unión del factor de crecimiento placentario, en particular hacia el anticuerpo dirigido hacia el factor de crecimiento placentario, su producción y uso.

- 5 La invención se refiere a asociados de unión del factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor* o *Placenta Growth Factor*, *P/GF*) en particular hacia el anticuerpo dirigido hacia el factor de crecimiento placentario, su producción y uso.

- 10 El P/GF está involucrado de manera decisiva en procesos fisiológicos y patológicos, en particular en la angiogénesis. Juega un papel importante en la progresión de tumores, en enfermedades renales que son provocadas en particular por diabetes mellitus, por psoriasis, desórdenes inflamatorios, en particular artritis reumatoide, por enfermedades cardiovasculares, entre 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.; Simoons, 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 predominantemente en la placenta y pertenece a la familia de proteínas del "nudo de cisteína". El P/GF está presente en diferentes formas. Son diferentes formas de P/GF (I) isoformas primarias e (II) isoformas secundarias. (III) además, puede diferenciarse entre P/GF (fP/GF) libre y P/GF (gP/GF) unido.

(I) Isoformas primarias de P/GF

- 20 Las isoformas primarias de P/GF son determinadas por la secuencia primaria, es decir el arreglo de los aminoácidos en la proteína. El empalme alternativo así como modificaciones post-traslacionales, como adiciones de glúcido, introducciones de fosfato, degradación (productos de degradación, fragmentos, etc.), introducciones de acetilo, etc., conducen a diferentes isoformas primarias de P/GF. 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 de P/GF-1 (número de secuencia (SN) 1V) se lee como sigue:

- 25 SN 1V:

```

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

```

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

- 30 Con ello, la secuencia de las isoformas primarias de P/GF-1 se lee como sigue:

SN 1:

```

1      ALPVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61     VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVRC RPLREKMK
121    KPERCGDAVP RR

```

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

- 40 Como primer aminoácido terminal en N de la isoforma primaria de P/GF-1, en lugar de alanina se indica frecuentemente metionina (M). Esto se refiere en general a P/GF-1 (rP/GF-1) recombinante, por ejemplo expresado en *Escherichia coli* (*E. coli*), en particular al rP/GF-1 humano (rhP/GF-1). Aquí emplea AUG como codón de inicio, el cual codifica para metionina. Un P/GF tal, expresado en *E. coli*, no posee modificaciones por vía post-traslacional, en particular tampoco adiciones de glúcido.

ES 2 529 106 T3

La secuencia de la isoforma primaria P/GF-I humana recombinante, es indicada en general de la manera siguiente:

SN 1RH:

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

5 Mediante empalme alternativo, en la isoforma P/GF-2 en lugar de la arginina (R) 124 se localiza la secuencia *RRR-PKGRGKRRREKQRPTDCHL*. De allí que la secuencia de la isoforma primaria P/GF-2 se lee:

SN 2:

```
1   ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61  VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM
121 KPERRRPKGR GKRREKQRP TDCHLCSGDAV PRR
```

10 Una inserción incorporada mediante empalme alternativo de 72 aminoácidos (HSPGRQSPDMPGDFRADAPSF LPPRRSLPMLFRMEWGCALTGSQSAVWPSSVPPEE PRMHPGRNGKKQQRK) conduce a la secuencia de la isoforma primaria P/GF-3:

SN 3:

```
1   ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61  VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRHSPGRQ
121 SPDMPGFRA DAPSF LPPRR SLPMLFRMEW GCALTGSQSA VWPSSVPPEE IPRMHPGRNG
181 KKQQRKPLRE KMKPERCGDA VPRR
```

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

15 SN 4:

```
1   ALPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61  VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRHSPGRQ
121 SPDMPGFRA DAPSF LPPRR SLPMLFRMEW GCALTGSQSA VWPSSVPPEE IPRMHPGRNG
181 KKQQRKPLRE KMKPERRRPK GRGKRRREKQ RPTDCHLCSGDA AVPRR
```

(II) Isoformas secundarias de P/GF

20 Las isoformas secundarias de P/GF surgen de la combinación de isoformas primarias de P/GF o de otras moléculas, en particular moléculas que son homólogas a P/GF. Las isoformas primarias de P/GF o bien otras moléculas representan subunidades de las isoformas secundarias de P/GF. En general, las isoformas secundarias de P/GF 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 primarias de P/GF 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 primaria P/GF y otra molécula, en particular un homólogo de P/GF como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus isoformas primarias. Son
25 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) unido

30 Puesto que P/GF forma complejos con asociados de unión, aparte de las isoformas son de considerar también las formas de P/GF que forman complejos o bien están unidas. En principio se diferencian las isoformas primarias libres, en particular sin embargo las isoformas secundarias de P/GF libres (P/GF, fP/GF libres), de las formas que forman complejos o bien están unidas (P/GF, gP/GF unidos). Por ejemplo GP/GF es homodímero de P/GF-1, el cual está presente en forma de complejo. Para esto puede ser un complejo sencillo, es decir un homodímero de P/GF-1 es un receptor, por ejemplo unido al receptor-1 (mFlt-1) de tirosina-quinasa similar a fms unido a la membrana. Otros

ejemplos son complejos con el Flt-1 (sFlt-1) soluble, con neurofilinas (NP; en particular NP-1 y NP-2), con el receptor que contiene dominio de quinasa/receptor de quinasa de hígado fetal (KDR/Flk-1, VEGFR-2), con proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG) así como sus isoformas, homólogos, fragmentos y productos de degradación. Asimismo, pueden concebirse complejos compuestos de varias capas de varias y, dado el caso, diferentes isoformas de P/GF y varios, y dado el caso, diferentes asociados de unión, en particular receptores.

La función de P/GF es facilitada, modulada o inhibida por la unión al receptor-1 de tirosina quinasa similar a fms soluble o unido a la membrana (receptor-1 de tirosina quinasa similar a fms (Flt-1) o factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)-receptor-1 (VEGFR-1)) así como al "receptor que contiene dominio de quinasa/receptor de quinasa de hígado fetal" (KDR/Flk-1 o VEGFR-2). Aparte de otras funciones posibles de P/GF, es relevante en particular la unión de P/GF a Flt-1 (mFlt-1) unido a la membrana. Esto conduce a la transfosforilación de mFlt-1 y activa con ello cascadas de transducción de señal [Iyer, S.; Acharya, K. R. Trends Cardiovasc Med 2002, 12, (3), 128-34.]. En contraste con esto, se asume de ello 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 asume de ello que la isoforma de P/GF desempeña un papel. P/GF -2, el cual en algunas circunstancias está asociado con la membrana, posee una inserción catiónica de 21 aminoácidos en el extremo terminal en carboxilo. Otras funciones pueden ser facilitadas mediante la unión de sustancias aniónicas, en particular polianiónicas como heparina, proteoglicanos de sulfato de heparina, etc.. La adición en N de un glúcido a asparagina (Asn) 84 así como la secuencia de aminoácidos que se localiza en el P/GF-3 pueden tener también implicaciones correspondientes. Además, de ello se asume que la unión de P/GF y VEGF tiene nuevamente otra implicación, puesto que aquí la expresión de VEGF y con ello su actividad son reguladas negativamente [Iyer, S.; Acharya, K. R Trends Cardiovasc Med 2002, 12, (3), 128-34.]. Resumiendo, eso significa que las diferentes formas de P/GF tienen diferentes funciones o bien actúan de manera diferente.

Estado de la técnica

Para los procedimientos de detección así como asociados de unión actuales, en particular anticuerpos, que son empleados en el presente para propósitos analíticos y diagnósticos, existe el problema de que diferentes formas de P/GF no se diferencian o no se diferencian de manera suficientemente eficiente (no suficientemente específica). Por ejemplo, el "anticuerpo P/GF antihumano" de R&D Systems, Inc. no reconoce exclusivamente determinadas formas de P/GF, en particular homodímeros de rhP/GF-1, sino también los heterodímeros 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).

Además, no se detectan exclusivamente fP/GF o gP/GF, es decir con los anticuerpos existentes no se diferencian fP/GF y gP/GF o se diferencian de manera no suficientemente eficiente. En particular, la detección específica de fP/GF es insuficiente. De esto se 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 confirma 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. muestran que el correspondiente ELISA R&D Systems (R&D Systems número de catálogo: AF-264-PB o bien DPG00) dejan reconocer concretamente una cierta especificidad para fP/GF, sin embargo las investigaciones realizadas muestran que esta especificidad es baja. Para la determinación de 0,5 ng/mL de rhP/GF-1 en presencia de 0,5 ng/mL de sFlt-1 se registra una reducción de señal de solamente aproximadamente 12 %. Igualmente para un exceso de 10 veces de sFlt-1 (5 ng/mL) ocurre solamente una reducción de señal en un factor de 2. Surgió una clara reducción de señal con una elevada especificidad del anticuerpo empleado hacia fP/GF.

Objetivo y su solución de acuerdo con la invención

Por consiguiente, la presente invención basó su objetivo en poner a disposición métodos o bien componentes que hagan posible la detección específica de determinadas formas de P/GF, en particular con ayuda de asociados específicos de unión, en particular anticuerpos.

La solución de este objetivo consiste en el suministro de los objetos y métodos de acuerdo con la invención descritos en las reivindicaciones.

En particular se logra el objetivo mediante el suministro de asociados de unión, en particular anticuerpos, que se unen de manera específica a P/GF. Estos asociados de unión, en particular anticuerpos, forman la base para la detección inmunológica y la determinación cuantitativa de las formas de P/GF libres. Esto aplica en particular para materiales biológicos, en particular muestras de plasma, para aplicaciones diagnósticas. Asimismo pueden concebirse aplicaciones terapéuticas.

Las diferentes formas de P/GF pueden ser detectadas como se describe a continuación. A continuación se ilustra en mayor detalle la elección de los asociados de unión y la elección de sustancias para la producción de asociados específicos de unión, para la detección específica del P/GF libre:

ES 2 529 106 T3

Son particularmente adecuados para la detección del FP/GF, en particular del P/GF no unido a m/sFlt-1, los asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, que se unen a los polos de las isoformas secundarias de P/GF en la región del dominio que se une al receptor.

5 En particular son asociados específicos de unión adecuados, en particular anticuerpos, los que son producidos empleando isoformas primarias y secundarias de P/GF libres, en particular isoformas secundarias de P/GF, preferiblemente homodímeros de P/GF, particularmente preferido homodímeros de P/GF-1, en particular homodímeros de rhP/GF-1, preferiblemente homodímeros de rhP/GF-1 con adición de glúcido en N, por ejemplo mediante inmunizaciones, y los cuales en la caracterización muestran que por la unión ocurren, o bien son necesarias, interacciones en la región de la posición de unión del receptor.

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

15 En particular, son de modo sorprendente particularmente adecuados como antígenos de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de fP/GF, los 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 construido de ambos monómeros.

20 Son particularmente adecuados como antígenos de inmunización los péptidos que contienen aminoácidos que son relevantes para las interacciones de receptores o péptidos que cubren ámbitos de secuencia en su proximidad. Los aminoácidos que son relevantes en particular pero no exclusivamente para interacciones de receptor de Flt-1, son representados subrayados a continuación dentro de la secuencia P/GF-1. A modo de ejemplo, se eligió para representación la secuencia P/GF-1. Estos aminoácidos son relevantes también para interacciones de receptor para las otras isoformas P/GF.

SN 1:

25 **1** ALPAVPPQW ALSAGNGSSE VEVVPQEVW GRSYCRALER LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC
61 VSLLRCTGCC GDENLHCVPV ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM
121 KPERCGDAVP RR

E-112 y P-115 forman una excepción, en particular sin embargo P-115, los cuales probablemente juegan un papel secundario o bien no juegan 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 (SN 3 y SN 4) descrita arriba.

30 El siguiente péptido es particularmente adecuado como antígeno de inmunización para la producción de anticuerpos específicos de fP/GF:

IAN 4: TFSQHVRC EC RPLREKMKPE RCGDAVPRR.

Para la inmunización, los antígenos de inmunización pueden ser empleados no unidos y/o unidos a un soporte. Para facilitar el acoplamiento a soportes típicos, por ejemplo proteínas, como albúmina de huevo, albúmina o hemocianina de lapa californiana, se sintetizan preferiblemente péptidos que contienen una lisina.

35 Como antígenos de inmunización pueden emplearse asimismo "sistemas de péptido antigénico múltiple" [Tam, J.P. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85, 5409-5413].

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

40 Mediante el empleo de gP/GF se detectan o bien se producen asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, 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.

45 Por ejemplo, para la producción de anticuerpos en la inmunización puede utilizarse P/GF, el cual forma un complejo con un asociado de unión. En particular, aquí puede tratarse de homodímeros de P/GF-1, que forman complejos con sFlt-1. Asimismo pueden emplearse los correspondientes complejos consistentes en los respectivos homólogos, fragmentos, etc.

ES 2 529 106 T3

A continuación se ilustra en mayor detalle la elección de sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de P/GF modificado por vía post-translacional, en particular con adición de glúcidos.

- 5 Para esto, se emplea P/GF o el correspondiente péptido con o sin modificación por vía post-translacional, para la producción de asociados específicos de unión, en particular anticuerpos. Los asociados específicos de unión son entonces adecuados de manera específica para detectar la ausencia o presencia de modificaciones por vía post-translacional.

- 10 Por ejemplo, pueden emplearse péptidos con adición de glúcidos en N, los cuales contienen la secuencia VETANVTMQ (IAN: 3-4) o parte 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, los cuales pueden ser empleados de manera específica para la detección de P/GF con adición de glúcido sobre asparagina 84 (N 84). Aparte de estos péptidos con adición de glúcidos en N, asimismo puede concebirse el empleo de P/GF con adición de glúcidos, o bien los correspondientes fragmentos.

- 15 Además, mediante el empleo de los correspondientes homólogos, péptidos sin adición de glúcidos, P/GF y los correspondientes fragmentos, pueden producirse asociados de unión, los cuales pueden ser empleados para la detección específica de P/GF sin adición de glúcidos.

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

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

IAN 5: REKMKPERR RPKGRGKRRR EKQRPTDCHL CGDAVPR.

En particular se emplean de manera preferida péptidos que contienen la secuencia subrayada o parte de ella.

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

- 30 Aparte de los asociados específicos de unión para P/GF-2, en particular anticuerpos, que son generados mediante la inmunización u otros procedimientos con las proteínas y péptidos arriba descritos, asimismo es posible emplear asociados específicos de unión como compuestos aniónicos, en particular compuestos polianiónicos, preferiblemente compuestos de heparina, en particular proteoglicanos de sulfato de heparina. En otra forma de operar, como asociados específicos de unión de P/GF-2 se emplean proteínas que se cuentan dentro de la familia de los receptores de semaforina, en particular neuropilina, preferiblemente neuropilina-1 (NP-1) y neuropilina 2 (NP-2).

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

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

- 40 IAN 6:

1 HVRCECRHSP GROSPDMPGD FRADAPSFLP PRRSLPMLFR MEWGCAITGS
51 QSAVWPSSPV PEEIPRMHPGR NGKKOQRKP LREKMK .

En particular se emplean preferiblemente péptidos, que contienen la secuencia subrayada o parte 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).

- 45 A continuación se ilustra en más detalle la elección de asociados de unión y la elección de las sustancias para la producción de asociados específicos de unión para la detección específica de P/GF-4:

ES 2 529 106 T3

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

5 IAN 7: NGKKQQRKPL REKMKPERRR PKGRG.

En particular se prefiere el empleo de péptidos que contienen los aminoácidos subrayados.

En particular son adecuados péptidos que contienen la siguiente secuencia: 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).

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

A continuación se ilustra en mayor detalle la elección de los asociados de unión y la elección de sustancias para la producción de asociados específicos de unión, para la detección específica de heterodímeros de P/GF/VEGF:

15 Puesto que el heterodímero de P/GF/VEGF contiene tanto secuencias específicas de P/GF (P/GF 1-4) como también secuencias específicas de VEGF (isoformas de VEGF), la detección de heterodímeros de P/GF/VEGF puede ser ejecutada con ayuda de asociados específicos de unión de P/GF, en particular anticuerpos que son producidos mediante antígenos, en particular péptidos, y anticuerpos de VEGF.

Además del asociado específico de unión de heterodímero VEGF/P/GF, se emplea KDR/FIk-1, sus isoformas, homólogos, fragmentos y productos de degradación.

20 En particular pueden emplearse también asociados específicos de unión, en particular anticuerpos, que fueron detectados o bien producidos mediante el uso de heterodímeros de VEGF/P/GF, por ejemplo mediante inmunizaciones, y que mediante la caracterización muestran que por la unión ocurren tanto interacciones con el monómero VEGF como también con el monómero P/GF.

25 Un método preferido para la producción de los péptidos de acuerdo con la invención, los cuales son empleados entre otros como antígenos de inmunización, es la síntesis en fase sólida donde se realiza la síntesis de un número múltiple de copias de un péptido sobre un núcleo de lisina [s. a. Tam J. P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5409-5413]. La síntesis de péptidos es ejecutada preferiblemente con ayuda de equipos, como se suministran por ejemplo de Applied Biosystems (EEUU), según un protocolo estándar. Tales péptidos multiméricos pueden estar unidos además a una proteína soporte.

30 Los asociados específicos de unión de acuerdo con la invención se unen a un epítipo. Se entiende por un "asociado específico de unión" a un miembro de un par específico de unión. Los miembros de un par específico de unión son dos moléculas, que exhiben en cada caso por lo menos una estructura complementaria a una estructura de la otra molécula, donde las dos moléculas están capacitadas para unirse por una unión de las estructuras complementarias. El concepto de molécula incluye también complejos de moléculas como por ejemplo enzimas, que consisten en apo- y coenzima, proteínas, que consisten en varias subunidades, lipoproteínas consistentes en proteínas y lípidos, etc.

35 Los asociados específicos de unión pueden ser de ocurrencia natural pero también pueden ser sustancias producidas por ejemplo por medio de síntesis química, técnicas microbiológicas y/o métodos de tecnología genética. La siguiente enumeración sirve para aclarar el concepto de asociado específico de unión, sin que sin embargo se limite a estas sustancias: globulina unida a tiroxina, proteínas que se unen a esteroides, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de diseño repetitivo, andamios de proteína, anquirinas, repeticiones ricas en leucina, anticalinas, duocalinas, lipocalinas, Affibodies®, antígenos, haptenos, enzimas, lectinas, ácidos nucleicos, en particular aptámeros, represores, oligo- y polinucleótidos, proteína A, proteína G, avidina, estreptavidina, biotina, componentes complementarios C1q, proteínas que se unen a ácidos nucleicos, etc. Por ejemplo son pares de unión

40 específicos: anticuerpo-antígeno, anticuerpo-hapteno, operador-represor, nucleasa-nucleótido, biotina-avidina, lectina- polisacárido, proteína que se une a esteroides, principio activo-receptor de principio activo, hormona-receptor de hormona, enzima-sustrato, IgG-proteína A, oligo- o polinucleótidos complementarios, etc.

45

En el sentido de esta invención, el concepto "péptido" incluye amidas de ácidos grasos, las cuales por hidrólisis se descomponen en aminoácidos, por ejemplo polímeros de aminoácidos como por ejemplo polipéptidos, oligopéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas.

50 Los péptidos de acuerdo con la invención pueden ser empleados como antígenos de inmunización, para la producción de anticuerpos de acuerdo con la invención o también para la limpieza de los anticuerpos de acuerdo con la invención, de equipos de cromatografía por afinidad. Además, los péptidos de acuerdo con la invención pueden ser empleados también en un método para la detección cuantitativa o cualitativa de P/GF libre. Los péptidos

de acuerdo con la invención pueden estar asociados también con una fase sólida y/o con un componente de un sistema que forma señal, por ejemplo en un inmunoensayo.

5 El concepto "antígeno" incluye antígenos monovalentes y polivalentes. Un antígeno polivalente es una molécula o un complejo de moléculas, sobre el(las) cuales(es) puede(n) unirse simultáneamente más de una inmunoglobulina, mientras que en un antígeno monovalente en cada caso puede unirse al mismo tiempo a sólo un anticuerpo individual. Como hapteno se denomina comúnmente una molécula que por sí misma no es inmunogénica, sino que para propósitos de inmunización comúnmente está unida a un soporte.

10 En el sentido de esta invención, bajo el concepto de "anticuerpo" se entiende una inmunoglobulina, por ejemplo una inmunoglobulina de la clase o bien subclase IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgM. Un anticuerpo exhibe por lo menos una posición de unión (denominada frecuentemente parátipe) para un epítipo (denominado frecuentemente también determinante antigénico) sobre un antígeno o hapteno. Tal epítipo es por ejemplo caracterizado 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 alto grado, es decir el anticuerpo es capaz de diferenciar pequeñas desviaciones en la estructura primaria, en la carga, en la configuración espacial, y la disposición estérica del antígeno o hapteno. En particular las denominadas "regiones determinantes de complementariedad" del anticuerpo contribuyen a la unión del anticuerpo al antígeno o hapteno.

20 En el sentido de esta invención, bajo el concepto "anticuerpo" 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, bi o oligoespecíficos, o "de cadena simple"; además también agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas y/o sus fragmentos, en tanto se preserven las propiedades de unión al antígeno o hapteno. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se producen mediante escisión enzimática de anticuerpos con enzimas como pepsina o papaína. Pueden generarse agregados, polímeros y conjugados de anticuerpos mediante diversos métodos, por ejemplo mediante tratamiento con calor, reacción con sustancias como glutaraldehído, reacción con moléculas que se unen a inmunoglobulina, adición de biotina a anticuerpos y subsiguiente reacción con estreptavidina o avidina, etc.

30 En el sentido de esta invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede haber sido producido según el método corriente, por ejemplo mediante inmunización del ser humano o un animal, como por ejemplo ratón, rata, cobayo, conejo, caballo, asno, oveja, cabra, gallina [ver 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 segregados; o mediante clonación y expresión de las secuencias de nucleótidos o bien versiones modificadas de ellos, los cuales codifican las secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión del anticuerpo natural al antígeno y/o hapteno.

35 Los anticuerpos de acuerdo con la invención son aquellos anticuerpos que se unen a los péptidos según la reivindicación 1.

40 Mediante la preparación de los anticuerpos de acuerdo con la invención es ahora posible para el experto, por ejemplo mediante experimentos de competencia [ver Peters et al. (1985) Monoklonale Anticuerpo, editorial Springer, capítulo 12.2 "Epítipo-Analyse"], identificar otros asociados específicos de unión, incluyendo específicamente anticuerpos, los cuales se unen al epítipo de un anticuerpo de acuerdo con la invención. De este modo, entretanto con ayuda de bibliotecas de despliegue de fagos se seleccionan asociados específicos de unión, mediante bancos de datos de péptidos sintéticos o por medio de " bibliotecas de anticuerpos de recombinación " [Larrick & Fry (1991) Human Antibodies and Hybridomas 2: 172-189].

También se manifiesta un anticuerpo de acuerdo con la invención, el cual está asociado con una fase sólida y/o con un componente de un sistema que forma señal.

45 En el sentido de esta invención, el concepto "fase sólida" contiene un objeto que consiste en material poroso y/o no poroso, por regla general insoluble en agua y que puede exhibir las más diferentes formas, como por ejemplo la de los recipientes, tubos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, varillas, cintas, 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 los más diversos materiales como por ejemplo en materiales orgánicos y/o inorgánicos, en materiales sintéticos, en materiales de ocurrencia natural y/o en 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 de dextrano entrelazadas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nylon; cerámica, vidrio, metales, en particular de metales nobles como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de los mismos; etc. En el concepto de fase sólida se incluyen también 50 células, liposomas o vesículas de fosfolípidos.

La fase sólida puede exhibir una cobertura de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, hidratos de carbono, sustancias lipófilas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de ellos, para por ejemplo reprimir o impedir la unión no específica de componentes de las muestras sobre la fase sólida o para por ejemplo alcanzar mejoramientos respecto a la estabilidad de la suspensión de fases sólidas que tienen partículas, a la estabilidad al almacenamiento, a la estabilidad de la forma o a la resistencia contra la luz UV, microbios u otros agentes con efecto destructivo.

Las micropartículas son empleadas frecuentemente como fase sólida y/o como etiqueta. En el sentido de esta invención, se entiende bajo el concepto "micropartícula" partículas que exhiben un diámetro aproximado de por lo menos 20 nm y no superior a 20 µm, comúnmente de entre 40 nm y 10 µm, preferiblemente entre 0,1 y 10 µm, particularmente preferido entre 0,1 y 5 µm, 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 o poros grandes. Las micropartículas pueden consistir en materiales orgánicos, inorgánicos o una mezcla o combinación de ambos. Ellas pueden consistir en un material poroso o no poroso, un material eréctil o no eréctil. En principio las micropartículas pueden tener cualquier densidad, sin embargo se prefieren partículas con una densidad que está cerca a la densidad del agua, como aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,5 g/ml. Las micropartículas preferidas pueden ser suspendidas en soluciones acuosas y tener una estabilidad en suspensión tan alta como sea posible. Ellas pueden ser porosas, parcialmente porosas o no porosas. Las micropartículas pueden consistir en varias capas, como por ejemplo las denominadas partículas "núcleo y concha" con un núcleo y una o varias capas de envoltura. El concepto de micropartícula incluye por ejemplo cristales de colorante, soles metálicos, partículas de sílica, partículas de vidrio, partículas magnéticas, partículas de polímeros, gotas de aceite, partículas de lípidos, dextrano y agregados de proteína. Las micropartículas preferidas pueden dispersarse en soluciones acuosas y consistir en partículas de materiales poliméricos insolubles en agua, en particular en polietilenos sustituidos. De modo muy particular se prefieren partículas de látex, por ejemplo de poliestireno, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ácido metacrílico, polímeros de acrilonitrilo, estireno-acrilonitrilo-butadieno, acetato de polivinilo-acrilato, polivinilpiridina, cloruro de vinilo-acrilato. Son de particular interés las partículas de látex con grupos reactivos sobre su superficie, como por ejemplo grupos carboxilo, amino o aldehído, que permiten una unión 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 de uno o varios componentes, donde por lo menos un componente es una etiqueta que puede ser verificada. Como etiqueta se entiende toda molécula que produce por sí misma una señal o que puede inducir la producción de una señal, como por ejemplo una sustancia fluorescente, una sustancia radiactiva, una enzima o una sustancia quimioluminiscente. La señal puede ser verificada o medida por ejemplo mediante la actividad enzimática, la luminiscencia, la absorción de luz, la dispersión de luz, la radiación electromagnética o radiactiva emitida o una reacción química.

Una etiqueta es capaz de generar en sí misma una señal detectable, de modo que no son necesarios otros componentes. Muchas moléculas orgánicas absorben la 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 de la luz irradiada. Nuevamente otras etiquetas pueden generar directamente una señal que puede ser verificada como por ejemplo isótopos radioactivos o colorantes.

Además, para la generación de señal otras etiquetas requieren de otros componentes, es decir el sistema productor de señal incluye en tal caso todos los componentes requeridos para la formación de señal con un por ejemplo sustrato, coenzima, sustancia que detiene la reacción, sustancia que acelera la reacción, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, iones, etc.

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

Un sistema que forma señal puede incluir también componentes que por cercanía espacial pueden entablar mutuamente una interacción verificable, por ejemplo en forma de donantes de energía y receptores de energía por ejemplo como sustancias que dan sensibilidad a la luz y sustancias quimioluminiscentes (EP-A2-0 515 194),

sustancias que dan sensibilidad a la luz 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) Clina. Chem. 39: 1953-1959] o fluoróforos y sustancias que detienen la fluorescencia (US 3,996,345).

5 Dentro de una interacción entre los componentes se incluye la transferencia directa de energía entre los componentes, por ejemplo por radiación de luz o de electrones, así como por moléculas químicas reactivas de corta vida. Además se incluyen dentro de ellos también los procedimientos en los cuales la actividad de un componente es inhibida o fortalecida por uno o varios otros, por ejemplo en la inhibición o elevación de la actividad enzimática o la inhibición, elevación o modificación (por ejemplo desplazamiento de la longitud de onda, polarización) de la radiación electromagnética transmitida por los componentes influenciados. La interacción entre los componentes incluye también cascadas de enzimas. En este caso están los componentes enzimas, de los cuales por lo menos uno suministra el sustrato para otro, de modo que resulta una velocidad de reacción máxima o mínima de la transformación del sustrato acoplado.

15 Por regla general tiene lugar una efectiva interacción entre los componentes, cuando éstos están presentes en vecindad espacial, por consiguiente por ejemplo dentro de un ámbito de separación de pocos μm , en particular dentro de un rango de distancia inferior a 600 nm, preferiblemente inferior a 400 nm, muy particularmente preferido inferior a 200 nm.

20 Debe entenderse ampliamente el concepto "asociado" 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 depresión o un espacio hueco, etc. En un enlace covalente los anticuerpos o asociados de unión se unen 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 o la unión de dos asociados específicos de unión. Aparte de una unión directa sobre la fase sólida o la etiqueta, los anticuerpos o asociados de unión pueden estar unidos también de manera indirecta mediante interacción específica con otros asociados específicos de unión, a la fase sólida o la etiqueta (ver EP-A2-0 411 945). Son ejemplos de esto: anticuerpos con adición de biotina, los cuales pueden estar unidos a la etiqueta mediante avidina unida a la etiqueta o un conjugado de anticuerpo-fluoresceína, el cual puede estar unido a la fase sólida mediante anticuerpo anti-fluoresceína unido a la fase sólida o un anticuerpo el cual puede estar unido a la fase sólida o a la etiqueta mediante proteína que se une a la inmunoglobulina.

Otro objetivo de esta invención son los anticuerpos o asociados específicos de unión de acuerdo con la invención que son empleados como diagnóstico in vitro o como un componente de un diagnóstico in vitro.

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

35 En el sentido de la invención, se entiende por una "muestra" el material que contiene presumiblemente la sustancia que va a ser detectada (ver 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, exudación, lavado broncoalveolar, líquido de linfa, líquido sinovial, líquido seminal, mucosa vaginal, heces, orina, fluidos, cabello, piel, cortes o muestras de tejido. Además se incluyen muestras de cultivo celular, líquidos o tejidos vegetales, muestras forenses, muestras de aguas y aguas residuales, alimentos, medicamentos. Dado el caso las muestras tienen que ser tratadas previamente, para que los analitos estén disponibles para el método de detección o para eliminar los componentes de la muestra que pueden causar deterioro. Tal tratamiento previo puede incluir la separación y/o lisis de células, la precipitación, la hidrólisis o desnaturalización de componentes de la muestra, como por ejemplo proteínas, la centrifugación de muestras, el tratamiento de la muestra con solventes orgánicos como por ejemplo alcoholes, en particular metanol; el tratamiento de las muestras con detergentes. Frecuentemente se transfieren las muestras a otro medio, comúnmente acuoso, con el cual los métodos de detección debieran tener la menor interferencia posible.

45 Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser empleados en un método para la detección cualitativa o cuantitativa de fP/GF en una muestra.

50 En 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 "detección cuantitativa" se incluyen también métodos semicuantitativos, los cuales registran sólo cantidades, concentración o actividad aproximadas del analito en la muestra o pueden conducir sólo a un dato relativo de cantidades, concentraciones o actividad. Se entiende por una detección cualitativa la detección general de la presencia del analito en la muestra o la indicación de que la concentración o actividad del analito en la muestra está por encima o por debajo de un determinado o varios determinados umbrales.

Con ello, la invención se refiere también a métodos para detección cualitativa o cuantitativa de fP/GF en una muestra, y reactivos adecuados para ello.

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 específicos de unión del 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 realiza hibridación de oligo- o polinucleótidos.

5 Las denominadas "pruebas de unión heterogénea " se caracterizan 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, filtración, separación magnética, unión sobre una fase sólida. En pruebas de unión heterogénea en forma de emparedado, se une por regla general uno de los asociados específicos de unión del analito a una fase sólida y sirve para la separación del complejo de unión "analito/asociado
10 específico de unión del analito" de la fase líquida, mientras que el otro asociado específico de unión del analito para la detección del complejo de unión, porta una etiqueta detectable como por ejemplo una enzima, una etiqueta de fluorescencia o de quimioluminiscencia, etc. Estos métodos de prueba son divididos adicionalmente en las denominadas pruebas de emparedado-una etapa, en las cuales se incuban los dos asociados específicos de unión simultáneamente con la muestra y en pruebas de emparedado-dos etapas, en las cuales la muestra es incubada
15 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.

En "pruebas de unión homogénea" no ocurre una separación entre los componentes libre y unido al complejo "analito/asociado específico de unión del analito" del sistema que forma señal. La carga de prueba, la cual contiene el asociado específico de unión del analito, los componentes que forman señal y la muestra, es medida después o
20 incluso durante la reacción de formación, sin otra etapa de separación y/o lavado, y se determina la correspondiente señal de medición. Son ejemplos de inmunoensayos homogéneos [ver Boguslaski & Li (1982) Applied Biochemistry and Biotechnology 7: 401-414] métodos turbidimétricos o nefelométricos, donde para la detección pueden estar vinculados los asociados específicos de unión del analito empleados, con partículas de látex, como por ejemplo pruebas EMIT®; pruebas CEDIA ®; inmunoensayos de fluorescencia-polarización; inmunoensayos de canalización de oxígeno luminiscente [LOCI®, ver 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. En un inmunoensayo de emparedado homogéneo, como por ejemplo una prueba nefelométrica de látex, se incuban conjuntamente los reactivos de anticuerpos con la muestra y se realiza la medición de la señal durante y/o después de la incubación, sin ejecutar una prueba de separación o lavado antes de la medición. En otras palabras: no ocurre ninguna separación del analito ligado al anticuerpo del analito libre o de anticuerpos que no están ligados a ningún analito.
30

Las pruebas de unión homogénea y heterogénea pueden ser ejecutadas también en forma de un denominado "ensayo de emparedado". Para esto se une el analito, por ejemplo en una prueba heterogénea de unión, a un asociado específico de unión del analito asociado a una fase sólida y un asociado específico de unión del analito el cual está vinculado con un componente de un sistema que forma señal. En los inmunoensayos de emparedado, anticuerpos o antígenos o haptenos pueden formar el asociado específico de unión del analito.
35

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 de acuerdo con la invención o un antígeno modificado del anticuerpo que va a ser verificado (= analito), y el otro asociado específico de unión del analito es por regla general una proteína que se une a la inmunoglobulina, como por ejemplo un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse de manera específica al anticuerpo que va a ser verificado (= analito).
40

En una "prueba de unión competitiva" homogénea o heterogénea compiten muestra-analito y reactivo-analito por la unión sobre un número limitado de asociados específicos de unión del analito. Por ejemplo el reactivo-analito es un "analito modificado", como por ejemplo un analito etiquetado o marcado, un segmento de analito como por ejemplo el péptido de acuerdo 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, por la unión sobre asociado específico de unión del analito asociado a fase sólida o (ii) muestra-analito compite con analito asociado a fase sólida (= reactivo-analito) por la unión sobre asociado específico de unión del analito, el cual está asociado con un componente de un sistema que forma señal.
45

50 La detección del P/GF libre con los anticuerpos de acuerdo con la invención 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 emparedado, prueba indirecta, prueba competitiva, pruebas de "punto de cuidado", etc. Por ejemplo estos y otros métodos de detección son descritos en "Labor und Diagnose", ed. L. Thomas, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1998, capítulo 60 o en "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", ed. T. Chard, Elsevier, Amsterdam, 1987.
55

El concepto "pruebas de punto de cuidado" o "pruebas POC" incluye pruebas en las cuales no se requiere ningún aparato separado de análisis o medición para la ejecución de la prueba o evaluación de la prueba. Las pruebas POC

5 se basan en muchos casos en métodos inmunocromatográficos, separaciones de inmunocomplejos por filtración y/o técnicas de inmunofijación. Las pruebas POC son concebidas en particular para mediciones en el sitio como por ejemplo en la cama del hospital o del hogar, para el médico de emergencias y/o para el médico establecido y menos para el trabajo hecho por personal sanitario. Las pruebas POC pueden ser ejecutadas en particular también por personas que no tienen formación técnica-médica ni experiencia en el campo de la medicina de laboratorio. En el sentido de esta invención, bajo el concepto "pruebas POC" se entienden también las denominadas pruebas de hogar o pruebas OTC, a las cuales se permite ser ejecutadas por profanos en la medicina, así como por ejemplo las diversas pruebas de gestación que son distribuidas para el uso casero. Otras pruebas POC se refieren por ejemplo a la detección de marcadores de infarto del corazón, medicinas, agentes medicinales, marcadores de infección y de inflamación. En muchas pruebas POC los asociados específicos de unión, están asociados o se asocian en el curso de la ejecución de la prueba, en o sobre tiras o discos de papel de filtro o de cromatografía. Por ejemplo, una reacción de detección positiva o negativa puede estar ligada a la aparición o no aparición de una banda de color en un determinado campo de prueba y/o la aparición o no aparición de un determinado símbolo como por ejemplo un "+", un "-" y/o la intensidad de la respectiva señal de medida.

15 Por ejemplo, una prueba POC para fP/GF puede estar construida así: sobre una tira de prueba se aplican muestra y anticuerpo específico etiquetado, los cuales tienen el poder de unirse sobre la forma fP/GF, pero no lo tienen o casi no lo tienen sobre otras formas P/GF. Son etiquetas adecuadas por ejemplo partículas coloreadas de látex, oro coloidal, enzimas etc. En tanto la forma fP/GF esté presente en la muestra, se forman complejos de anticuerpo/fP/GF. Estos complejos se mueven por ejemplo por medio de fuerza capilar en la dirección de un campo, en el de otro asociado específico de unión, en particular anticuerpo, el cual le dan capacidad de unirse a otro epítipo de fP/GF y los cuales por ejemplo están fijados en forma de una banda o se fijan en el curso del método de prueba (por ejemplo mediante un puente biotina-avidina). Los complejos anticuerpo/fP/GF etiquetado se unen en este campo y forman con el asociado específico fijado, en particular anticuerpos, un complejo de emparedado. Aquí, la intensidad de la señal de etiqueta es proporcional a la concentración de fP/GF en las muestras. Por ejemplo, en un método de prueba POC competitiva los fragmentos de anticuerpo pueden estar fijos en un campo de la tira de prueba o fijarse en el curso del método de prueba. Estos anticuerpos fijos compitieron con la forma fP/GF de la muestra por la unión sobre anticuerpo/anti-fP/GF etiquetado. De modo alternativo, para la construcción de una prueba fP/GF competitiva pueden emplearse también anticuerpo/ fP/GF fijado y proteína/fP/GF etiquetado o bien el péptido de acuerdo con la invención.

20
25
30 Una forma particularmente preferida de operar del método de acuerdo con la invención es una prueba nefelométrica o una prueba turbidimétrica, en particular una prueba tal en la cual se emplean los anticuerpos de acuerdo con la invención, asociados preferiblemente sobre micropartículas (en particular sobre partículas de látex).

Otro objetivo de acuerdo con la invención es un kit de prueba el cual contiene uno o varios de los anticuerpos y/o péptidos de acuerdo con la invención. En tal kit están presentes en forma empacada comúnmente todos o sólo algunos componentes de una prueba. El anticuerpo y/o péptido de acuerdo con la invención pueden estar asociados por ejemplo con una o varias fases sólidas y/o uno o varios componentes de un sistema que da señal. Por ejemplo el kit de prueba puede contener estándares, controles así como otros reactivos, como por ejemplo tampones, soluciones de lavado, soluciones y/o enzima sustrato que liberan señal de medición, cubetas, pipetas y/o instrucciones de prueba. Un kit de prueba de acuerdo con la invención particularmente preferido contiene asociados sobre partículas de látex, anticuerpo de acuerdo con la invención y/o péptido de acuerdo con la invención.

35
40
45 El anticuerpo y péptido de acuerdo con la invención son empleados también para la cromatografía de afinidad. Bajo el concepto "cromatografía de afinidad" se entiende un método para la purificación y aislamiento de sustancias, en particular biopolímeros, el cual se basa en la circunstancia de que muchas sustancias pueden entrar en una unión reversible, selectiva, no covalente con asociados de unión que son específicos para ella. El principio del método consiste en que se pone en contacto el asociado específico de unión, unido por regla general de manera covalente sobre una matriz insoluble (por ejemplo vidrio poroso, geles a base de agarosa, celulosa, dextrano, polímeros y sílica) y en contacto con una muestra que contiene la sustancia. Debido a su interacción específica con el asociado específico de unión ligado a la matriz, la sustancia investigada es inmovilizada y retenida, mientras que todas las otras sustancias presentes en la muestra son separadas por elución. A continuación se remueve de la matriz la sustancia investigada, con un agente adecuado de elución el cual rescinde la unión no covalente entre la sustancia y el asociado específico de unión (ver E. Buddecke, 1989, Grundrisse der Biochemie, Walter von Gruyter, capítulo 7 "Proteine").

50
55 Se manifiestan también anticuerpos de acuerdo con la invención, que son empleados como un agente terapéutico. Esto incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención o un péptido de acuerdo con la invención en un medio de inyección estéril, farmacéuticamente compatible. Se entiende por un medio de inyección estéril farmacéuticamente compatible por ejemplo una solución libre de pirógenos, libre de gérmenes, por ejemplo salina u otra solución de electrolitos, cómo se emplean comúnmente para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea de medicamentos, vacunas o medios de contraste.

60 Se describe también el empleo de los anticuerpos de acuerdo con la invención como agentes de diagnóstico o como componentes de un agente de diagnóstico.

Además, aquí se describe un método para la producción de un anticuerpo de acuerdo con la invención, el cual se caracteriza porque es empleado para la inmunización de uno o varios de los péptidos según la reivindicación 1.

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

5 Además, se describe aquí el empleo de proteínas, isoformas de proteínas, fragmentos, productos de degradación, homólogos y péptidos, como materiales de referencia, estándares, agentes para calibración y controles. Los materiales de referencia son materiales o sustancias que poseen propiedades que son establecidas de modo y forma que los materiales de referencia son empleados como agentes de calibración, estándares y controles. Además, los materiales de referencia pueden emplearse para la validación de métodos de medida y para la
10 asignación de valores determinados, en particular "valores correctos convencionales". El empleo de materiales de referencia como agentes para calibración, estándares y controles o el empleo de agentes de calibración, estándares y controles, los cuales se refieren a materiales de referencia o bien a los "valores correctos convencionales" allí indicados, es importante para el control de la calidad y el aseguramiento de la calidad.

15 Los péptidos empleados como antígenos de inmunización pueden ser empleados para la inmunización, de manera no unida y/o unida a un soporte.

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

El antígeno de inmunización puede ser incorporado por ejemplo en solución salina con tampón de fosfato y ser adicionado a adyuvante de inmunoensayo de ratón. Ésta emulsión puede ser aplicada entonces por ejemplo por vía intradérmica, intraperitoneal y/o subcutánea en un animal como por ejemplo un conejo, un ratón, una rata, un
25 cobayo, un caballo, un asno, una oveja, una cabra, una gallina, etc. Inyecciones de refuerzo, donde el antígeno de inmunización puede estar emulsificado también con adyuvante incompleto de Freund, pueden ayudar a elevar la respuesta inmune.

Los anticuerpos policlonales de acuerdo con la invención pueden también ser producidos a partir del antisero de animales inmunizados y pueden ser purificados adicionalmente por cromatografía de afinidad sobre una matriz,
30 sobre la cual están unidas por ejemplo las correspondientes formas P/GF o los péptidos empleados como antígenos de inmunización.

Para generar los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, se mezclan según los métodos conocidos en general [ver Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Peters et al. (1985) Monoklonale Anticuerpo: Herstellung y Charakterisierung, editorial Springer] las células
35 inmunes 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 clones adecuados. La elección de los clones que producen los anticuerpos monoclonales deseados es ejecutada con ayuda de métodos específicos de tamización. Para eso se confirma la especificidad de unión del anticuerpo suministrado en el sobrenadante de cultivo celular, por ejemplo en el antígeno de inmunización o sobre un eventual soporte del
40 antígeno de inmunización, por medio de inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo y/o Western Blot. Los hibridomas que producen anticuerpos de acuerdo con la invención son multiplicados por vía clonal. Las líneas de células de hibridoma así producidas están disponibles entonces para una producción duradera de anticuerpos monoclonales. Se producen grandes cantidades de anticuerpos por ejemplo a partir de sobrenadantes de cultivo celular, en particular a partir de fermentadores o cultivos en rodillos así como de ascites.

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 los métodos enzimáticos de escisión conocidos por los expertos [ver Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor].

Las posiciones de unión de los antígenos de un anticuerpo se encuentran en los denominados dominios variables, los cuales son codificados por los genes V. Con los métodos de técnica genética conocidos [por ejemplo Sambrook
50 et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, segunda edición; McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552-554] puede determinarse también la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos de un anticuerpo de acuerdo con la invención así como mediante ello también la correspondiente secuencia de aminoácidos, en tanto ésta no fuera conocida ya por determinación de secuencia de aminoácidos.
55 Como material de partida para tales análisis pueden emplearse las células de hibridoma o bien las células inmunes que producen anticuerpos de animales inmunizados.

Con conocimiento de secuencia de los ácidos nucleicos y/o aminoácidos pueden producirse entonces con ayuda de métodos comunes de tecnología genética y biología molecular [ver Johnson & Chiswell (1993) Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571] anticuerpos humanizados, quiméricos, bi- u oligoespecíficos así como péptidos derivados de la "región determinante de complementariedad ("unidades de reconocimiento mínimo"), fragmentos de cadena simple, y/o productos funcionales de fusión, por ejemplo estructuras de anticuerpo-enzima producidos por vía recombinante [ver 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 a los respectivos epítopes específicos de las formas P/GF, en particular sobre un péptido de acuerdo con la invención. Con tales péptidos incluidos dentro del concepto "anticuerpos" pueden alcanzarse por ejemplo una reducción en la capacidad de generar inmunidad y/o una mayor eficacia por administración como medicamento o agente de diagnóstico in vivo, y/o surgen ventajas para el empleo como o en un agente de diagnóstico in vitro. Los anticuerpos pueden ser producidos también, dado el caso, con la ayuda de métodos de tecnología genética, en hongos como por ejemplo células de hongos [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.

Son dignos de mencionarse también hongos, células animales, vegetales o procarióticas así como células humanas aisladas, que producen un anticuerpo de acuerdo con la invención. Una forma particular incluye líneas de célula de hibridoma, que producen anticuerpos de acuerdo con la invención.

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

20 **Ejemplo 1:** producción de anticuerpos monoclonales específicos de fP/GF

a) inmunización de ratones

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 LRCTGCCGDENLHCVPVET (IAN 2)) en adyuvante de inmunoensayo de ratón (Qiagen GmbH, Alemania). Se sintetizó IAN 2 por medio de una síntesis en fase sólida según métodos generalmente conocidos. Después de 4 y 8 semanas ocurrió una inyección de refuerzo con en cada caso 20 µg de antígeno de inmunización sin adyuvante. Los últimos 3 días antes de la fusión se realizó refuerzo por vía intravenosa al ratón 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 bazos y se producen suspensiones individuales de células en Eagle Medium libre de suero modificado con Dulbeccos (DMEM; PAN Biotech GmbH, Alemania). Se separan las células por centrifugación (652 x g) y se lava 2 veces en DMEM. A continuación se determina el número de células por medio de tinción Azul Trypan. A aproximadamente 10⁸ células de bazo se añaden 2 x 10⁷ células de mieloma (Sp2/0). Después del paso por la centrifuga (360 x g) se descarta el sobrenadante, se añade a la pella de células 1 ml de solución de polietilenglicol (PEG 4000, Merck Eurolab GmbH, Alemania; aproximadamente al 50 % en DMEM) y después de suspender nuevamente, se incuba por 1 minuto a 37 °C. A continuación se añaden aproximadamente 10 ml de DMEM y se incuba a temperatura ambiente por 2 a 4 minutos. Se separan por centrifugación las células fundidas (326 x g) y se suspende nuevamente la pella en DMEM + 10 % de suero fetal de ternero (Bio Whittaker Europe, Bélgica) + medio HAT (CC Pro GmbH, Alemania) y se colocan en placas de cultivo celular de 24 pozos (Corning Costar GmbH, Alemania). La concentración de celulosa aproximada es de 5 x 10⁴ a 5 x 10⁵ células por pozo.

Después de 2 a 3 semanas se extraen las colonias celulares formadas (híbridas) y se transfieren a nuevas placas de cultivo.

c) Tamización

Se prueba la especificidad de los anticuerpos colocados en el cultivo celular, en una primera etapa de prueba con ayuda de placas de microtitulación (Nunc GmbH & Co. KG, Alemania), las cuales están recubiertas con un péptido con la secuencia de aminoácidos LRCTGCCGDENLHCVPVET.

Se transfieren con pipeta a cada depresión de la placa de microtitulación 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 colocan en cada depresión 100 µl de conjugado 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 otros dos lavados de la placa se colocan en cada depresión 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 la incubación se colocan en cada depresión 100 µl de solución de detención POD (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se evalúa la

ES 2 529 106 T3

placa de microtitulación en el BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II, Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) a 450 nm.

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

5 d) Clonación

Se realiza clonación a células individuales de híbridos que producen anticuerpos específicos de fP/GF, con un micromanipulador (Leitz Messtechnik GmbH, Alemania). Se purifican los sobrenadantes del cultivo de estos clones como se describe bajo g) y se realiza caracterización como se describe bajo e), h) y i).

e) Determinación de la subclase de anticuerpos

- 10 Se determina la subclase de anticuerpos hacia fP/GF, por medio de kit de determinación de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip™ de la compañía Boehringer Mannheim, Alemania.

f) Producción del anticuerpo

- 15 Para la producción de grandes cantidades de anticuerpo se transfieren los correspondientes clones de células a matraces de rodillo (Coming Costar GmbH, Alemania), y se completa hasta el volumen final deseado a + 37 °C. Después de ello se filtra la suspensión de cultivo en rodillo, para eliminar las células mayores a 0,22 µm. La solución de anticuerpo ya libre de células es concentrada sobre ultrafiltro (frontera de separación 30.000 Dalton) y a continuación se purifica.

g) Purificación del anticuerpo

- 20 A la solución obtenida de anticuerpo se añade tampón de fosfato 0,14 M y pH 8,6 y se aplica sobre una columna de cromatografía llena con rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences Europe GmbH, Alemania) (por 10 mg de anticuerpo que va a ser purificado se emplea 1 ml de rProteína A Sepharose™ Fast Flow). Todos los componentes no ligados son eliminados mediante lavado de la columna con tampón de fosfato 0,14 M y pH 8,6. Se realiza elución de la columna a los anticuerpos ligados, con ácido cítrico 0,1 M y pH 3,0 y se 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 del anticuerpo adecuado para un ELISA de emparedado fP/GF

Se investiga la reacción del anticuerpo monoclonal anti-fP/GF con el epítipo específico de fP/GF (por ejemplo el péptido con la secuencia de aminoácidos LRCTGCCGDENLHCVPVET):

Reacción con fP/GF:

- 30 Como fase sólida se emplea una placa de microtitulación, la cual está recubierta con fP/GF. Después de ello se incuba el anticuerpo anti-fP/GF de sobrenadante de cultivo. Después de una etapa de lavado se detecta una unión del anticuerpo al P/GF mediante un conjugado consistente en anticuerpos policlonales anti-ratón de conejo y la enzima peroxidasa, con subsiguiente reacción de color.

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

- 35 Como fase sólida se emplea una placa de microtitulación, la cual está recubierta con fP/GF. Para ello se incuba sFlt-1. El sFlt-1 que es empleado para ello aquí, es "quimera VEGF R1 (Flt-1)/Fc 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 sobrenadante de cultivo. Después de una etapa de lavado, no es detectable o lo es sólo una pequeña unión de anticuerpo específico de anti-fP/GF, puesto que las posiciones de unión están ocupadas predominantemente por sFlt-1. El anticuerpo no específico de fP/GF se liga de manera incrementada también al complejo sFlt-1 / P/GF, es decir gP/GF. Después de una etapa de lavado se detecta una unión de este anticuerpo no específico mediante un conjugado, consistente en anticuerpos policlonales anti-ratón de conejo y la enzima peroxidasa, con subsiguiente reacción de color.

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

De modo correspondiente se seleccionan anticuerpos específicos de fP/GF. Se investiga la habilidad de estos anticuerpos para su empleo como anticuerpos de fase sólida en un ELISA de emparedado con anticuerpo conjugado

específico de fP/GF, el cual está acoplado a peroxidasa de rábano picante con un método conocido por los expertos (por ejemplo conjugación de Nakane).

La confirmación de la habilidad ocurre en el ELISA de emparedado, como se describe en el ejemplo 2a). Los criterios esenciales de decisión para la habilidad son una categórica diferenciación entre fP/GF y complejo sF1t-1 / P/GF. Otros criterios son la frontera inferior de detección y el comportamiento lineal de la curva de calibración.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpo monoclonal específico de fP/GF

a) Inmunización de ratones

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 inmunoensayo de ratón (Qiagen GmbH, Alemania). Se sintetizó IAN 2-1-1K por medio de una síntesis en fase sólida según métodos generalmente conocidos. Se confirmó 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: TFA 0,1 %/agua y como tampón B: FFA 0,08 %/acetonitrilo. La rata de flujo fue 0.8 ml. La detección ocurrió a 220 nm. Además se ejecutó una espectrometría de masas de ionización desorción por láser en matriz asistida (MALDI-MS). El pico principal estuvo en 1075 m/z. Después de 4 y 8 semanas ocurrió una inyección de refuerzo con en cada caso 20 µg de antígeno de inmunización sin adyuvante. Los últimos 3 días antes de la fusión se realizó refuerzo por vía intravenosa al ratón, con en cada caso 10 µg de antígeno de inmunización.

La fusión b), la clonación d), la determinación de subclase de anticuerpo e), la producción del anticuerpo f), la purificación del anticuerpo g) y la selección del anticuerpo adecuado para un ELISA de emparedado de fP/GF h), ocurren como en el Ejemplo 1. Asimismo, para la tamización c) se procede como en el ejemplo 1. Con la excepción de que se prueba la especificidad del anticuerpo suministrado en el cultivo celular en una primera etapa de prueba, con ayuda de placas de microtitulación (Nunc GmbH & Co. KG, Alemania), las cuales están recubiertas con un péptido con la secuencia de aminoácidos GCCGDENLHK (IAN: 2-1-1K).

Ejemplo 3: detección de fP/GF en una muestra

a) Método de prueba A

Se emplean anticuerpos anti-P/GF conjugados con peroxidasa en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-fP/GF de acuerdo con la invención, en un inmunoensayo enzimático según el principio de emparedado.

Durante la primera incubación se une el fP/GF presente en la muestra - en tanto esté presente - al anticuerpo de acuerdo con la invención dirigido hacia fP/GF, el cual está fijo sobre la superficie de las depresiones de una placa de microtitulación. Después de lavar las depresiones, en una segunda reacción de unión se emplean anticuerpos anti-P/GF conjugados con peroxidasa, los cuales están dirigidos hacia un epítipo cualquiera de P/GF - con excepción del epítipo que se une al receptor. Con ayuda de anticuerpos anti-P/GF específicos conjugados con peroxidasa, puede detectarse en este método de prueba en principio también la presencia de determinadas isoformas de P/GF. Por ejemplo, para la detección de P/GF-1 puede emplearse un anticuerpo específico de P/GF-1, etc. En principio es posible también la detección de la presencia de diferentes isoformas de P/GF con diferentes anticuerpos específicos. Los excesos de anticuerpos conjugados con enzima son eliminados por lavado. A continuación se determina la actividad de enzima unida en las depresiones. La reacción enzimática de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina es interrumpida por la adición de ácido sulfúrico diluido. La intensidad de color proporcional a la concentración de antígeno fP/GF es determinada por vía fotométrica a una longitud de onda de 450 nm y valorada bien sea de manera cualitativa en un valor de referencia de un solo lado o mediante una curva de calibración de estándares.

Tal inmunoensayo de emparedado de acuerdo con la invención detecta de manera específica fP/GF en sólo un método de ensayo.

b) método de ensayo B

Se emplean anticuerpos monoclonales anti-fP/GF conjugados con peroxidasa de acuerdo con la invención en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-fP/GF de acuerdo con la invención, en un inmunoensayo enzimático según el principio de emparedado.

Como en el método de ensayo A, durante la primera incubación el fP/GF presente en la muestra - en tanto esté presente - se une al anticuerpo de acuerdo con la invención dirigido hacia fP/GF, el cual está fijo sobre la superficie de las depresiones de una placa de microtitulación. Después del lavado de las depresiones se emplean en una segunda reacción de unión anticuerpos anti-fP/GF conjugados con peroxidasa. Se lavan los anticuerpos en exceso conjugados con la enzima. A continuación se determina la actividad de la enzima ligada en las depresiones. Se

ES 2 529 106 T3

interrumpe la reacción enzimática de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina mediante la adición de ácido sulfúrico diluido. La intensidad de color proporcional a la concentración de antígeno de fP/GF es determinada por vía fotométrica a una longitud de onda de 450 nm y se valora bien sea de manera cualitativa mediante un valor de referencia de un solo lado o mediante una curva de calibración de estándares.

- 5 Tal inmunoensayo de emparejado de acuerdo con la invención detecta de manera específica fP/GF en sólo un método de ensayo fP/GF. El método de ensayo B es por ello particularmente preferido porque en general el fP/GF está presente como homodímero, por ejemplo como homodímero fP/GF-1, y en ambos polos del homodímero puede estar unido al receptor. En el método de prueba B se emplea un inmunoensayo enzimático según el principio de emparejado, el cual emplea un anticuerpo anti-fP/GF inmovilizado y un anticuerpo anti-fP/GF conjugado con peroxidasa, de modo que se determina predominantemente fP/GF, el cual en ninguno de los dos polos exhibe asociado de unión.
- 10

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

15 **Ejemplo 4:** producción de otros anticuerpos monoclonales específicos de fP/GF

Se produjeron, seleccionaron y se examinaron respecto a su reconocimiento de formas libres y unidas de P/GF, los siguientes anticuerpos monoclonales de modo correspondiente al Ejemplo 1. Para la inmunización se emplearon los antígenos de inmunización indicados en la siguiente tabla. 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 recombinante humano; R&D Systems, Nr. de catálogo: 264-PG/CF | P/GF libre |
| Anticuerpo monoclonal | Antígeno de inmunización | Especificidad |
| 05-61/016 05-63/020 (Anticuerpo de comparación) | P/GF recombinante humano; 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 |
| 05-121/06 05-120/03 (Grupo 3) | IAN 1-1-2 (VVPFQEVWGRSY) | P/GF libre |
| R&D Systems MAB264 | | P/GF libre y unido |

ES 2 529 106 T3

| | | |
|---|--|--|
| (Anticuerpo de comparación, estado de la técnica) | | |
|---|--|--|

5 Los cultivos celulares que producen los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención o anticuerpo de comparación indicados en la tabla fueron depositados en el DSMZ (Deutsche Sammlung de Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, República Federal Alemana, según el acuerdo de Budapest bajo los números de entrada indicados a continuación, asignados de las posiciones internacionales de depósito:

| | | |
|----|------------------------------|---------------|
| | Cultivo celular 2005-81-05 | = DSM ACC2764 |
| | Cultivo celular 2005-81-010 | = DSM ACC2765 |
| | Cultivo celular 2005-64/026 | = DSM ACC2766 |
| 10 | 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 |
| | Cultivo celular 2005-164/042 | = DSM ACC2771 |
| 15 | 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 |

Para todos los cultivos celulares mencionados arriba la fecha de depósito es el 23.03.2006.

20 **Ejemplo 5:** reactividad de los anticuerpos de acuerdo con la invención y de los anticuerpos de comparación con P/GF recombinante (libre)

Se recubrieron placas de microtitulación (Compañía Nunc, tipo B), con anticuerpos policlonales hacia IgG /F(ab)₂ de ratón (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania); concentración de recubrimiento 10 µg/ml ≈ 1,5 µg/depresión.

25 Se colocaron con pipeta en las depresiones de la placa de microtitulación 100 µl de los anticuerpos monoclonales bajo investigación en una concentración de a) 1,0 µg/ml o b) 0,1 µg/ml y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar por tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD (número de producto: OSEW; Compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) se colocaron en cada depresión 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 por tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD

30 se colocaron en cada depresión 100 µl de conjugado anti-humano-P/GF-POD (producido por medio de un método convencional de conjugación a partir de "anticuerpo humano policlonal purificado por afinidad P/GF ", número de producto: AF-264-PB / R&D Systems) 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 depresión 100 µl de solución cromógena TMB (número de producto: OUVF, Compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a

35 +25°C. Después de la incubación se colocaron en cada depresión 100 µl de solución de detención POD (número de producto: OSFA, Compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se evaluaron las placas de microtitulación en el BEP II (Compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) a 450 nm. En la tabla 1 se listan los resultados.

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

| | | Extinción a 450 nm | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|-----------|-----------|------------|---|------------|---|-----------|---------------------------|-----------|--|-----|
| Concen- tración de anti- cuerpo [µg/ml] | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 1 | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 2 | | | | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 3 | | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 3 | | Anticuerpo de comparación | | Anticuerpo según el estado de la técnica | |
| | | 05-54/04 | 05-64/026 | 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 | 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 | |

ES 2 529 106 T3

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

5 Se recubrieron placas de microtitulación (Compañía Nunc, tipos B), con anticuerpos policlonales hacia IgG/Fc humano (Compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania). Concentración de recubrimiento 2,5 µg/ml ≈ 0,376 µg/depresión.

10 En las depresiones de las placas de microtitulación se colocaron en cada caso 100 µl de una solución de quimérico VEGFR1 (Flt-1)/Fc recombinante humano: 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 por tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD (ver ejemplo 5) para la producción del complejo P/GF/sFlt-1 se colocaron en cada depresión 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. Después de lavar por tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD se colocaron con pipeta en cada depresión 100 µl de anticuerpo monoclonal que iba a ser investigado, 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 por tres veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD se depositaron en cada depresión 100 µl de conjugado 15 IgG/F(ab)₂-POD anti-ratón (Compañía Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de otro lavado por tres veces de las placas de microtitulación se depositaron en cada depresión 100 µl de solución cromógena TMB (ver ejemplo 5) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de la incubación se colocaron en cada depresión 100 µl de solución de detención POD (ver ejemplo 5) y se evaluaron las placas de microtitulación en el BEP II (ver ejemplo 5) a 450 nm. Los resultados son listados en la tabla 2.

20

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

| | | Extinción a 450 nm | | | | | | | | | | |
|---|---|---|-----------|----------|-----------|------------|------------|---|---------------------------|------------|---|-----------|
| Concen- tración de anti- cuerpo [µg/ml] | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 1 | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 2 | | | | | | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 3 | Anticuerpo de comparación | | Anticuerpo según el estado de la técnica R&D Systems: MAB264 | |
| | | 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 |
| 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 de acuerdo con la invención no muestran ninguna reacción con el complejo P/GF/sFlt-1 formado. Donde el anticuerpo de comparación y el anticuerpo del estado de la técnica muestran una clara reacción.

Ejemplo 7: levantamiento del mapa del epítipo

5 Se realizó un examen sistemático exploración de péptidos que se solapan, los cuales se derivaban de la secuencia de P/GF humano (péptidos de 13 unidades, 11 aminoácidos que se solapaban), con ayuda de la tecnología de síntesis SPOT. Los métodos están descritos en: Wenschuh, H. et al. (2000) "Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptid", Biopolymers (Peptid Science), 55:188-206. Los péptidos fueron sintetizados en disposiciones definidas (como "arreglo de péptidos") por etapas en membranas de celulosa, de manera que ellos estaban presentes de modo acoplado en forma covalente sobre la membrana de celulosa. Se
10 realizaron inmediatamente sobre los arreglos pruebas de unión para confirmar la inmunorreactividad de los péptidos. Para ello el protocolo de incubación transcurrió como sigue:

- Equilibrado en tampón de TBS, pH 8.0
- Tampón de bloqueo 2 h, pH 8.0
- Incubación del anticuerpo 2 h (3 µg/ml) en tampón de bloqueo, pH 8.0
- 15 • Lavado con TBS (Tween 20 0.05 %)
- Incubación por 2 h con IgG-POD anti-ratón en tampón de bloqueo, pH 8.0
- Lavado 3 x 5 min con TBS (Tween 20 0.05 %)
- Detección por medio de quimioluminiscencia (Lumi-Imager, Roche Diagnostics)

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

1. EKMKPERCGDAVP
2. MKPERCGDAVPRR

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

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

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

Ejemplo 8: reacción con P/GF

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

35 Se transfirieron con pipeta a las depresiones de las placas de microtitulación 100 µl de una serie geométrica de dilución que comenzaba 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 por tres veces las placas con solución de lavado POD (ver ejemplo 5) se depositaron en cada depresión 100 µl de conjugado P/GF-POD anti-humano (ver ejemplo 5) y se incubó por 1,5 hora a +15 a +25°C. Después de otro lavado por tres veces de las placas, se colocaron en cada depresión 100 µl de solución cromógena de TMB (ver ejemplo 5) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de la incubación se depositaron en cada depresión 100 µl de solución de detención POD (ver ejemplo 5) y se valoraron las placas de microtitulación en el BEP II (ver ejemplo 5) a 450 nm. En la tabla 3 se listan los resultados.

Tabla 3: determinación de la reactividad con P/GF

mediante evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm.

| Conc. [$\mu\text{g/ml}$] | | Extinción a 450 nm | | | | | | |
|----------------------------|------|---|-----------|----------|-----------|---------------------------|-----------|--|
| | | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 1 | | | | Anticuerpo 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 de acuerdo con la invención, del anticuerpo de comparación y del anticuerpo del estado de la técnica con complejo P/GF/sFlt-1 (gP/GF)

Se recubrieron placas de microtitulación (ver ejemplo 5), con los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, con anticuerpos de comparación y con anticuerpos monoclonales del estado de la técnica. Concentración de recubrimiento $3 \mu\text{g/ml} \approx 0,45 \mu\text{g/depresión}$.

10 En un matraz de reacción se produjo una serie geométrica de dilución que comenzaba con 25 ng/ml de P/GF recombinante. A cada dilución se dosificó VEGF R1 (Flt-1)/Fc quimérico recombinante humano (ver ejemplo 6) en una concentración de 400 ng/ml y se incubó por 1 hora a $+15$ a $+25^\circ\text{C}$. A continuación se colocaron con pipeta en las depresiones de las placas de microtitulación, en cada caso $100 \mu\text{l}$ y se incubó por 1 hora a $+15$ a $+25^\circ\text{C}$. Después de lavar por cuatro veces las placas de microtitulación con solución de lavado POD (ver ejemplo 5) se depositaron en cada depresión $100 \mu\text{l}$ de conjugado VEGF R1-POD anti-humano (Compañía R&D Systems, parte 891096 de Quantikine Human VEGF R1 Immunoassay; DVR100B) y se incubó por 1 hora a $+15$ a $+25^\circ\text{C}$. Después de otro lavado por tres veces de las placas de microtitulación se colocaron en cada depresión $100 \mu\text{l}$ de solución cromógena de TMB (ver ejemplo 5) y se incubó por otros 30 minutos a $+15$ a $+25^\circ\text{C}$. Después de la incubación se depositaron en cada depresión $100 \mu\text{l}$ de solución de detención 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 4.

20

ES 2 529 106 T3

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.

| Concentración [ng/ml] | | Extinción a 450 nm | | | | | | |
|--------------------------|------------|--|---------------|--------------|---------------|------------------------------|-----------|---|
| | | Anticuerpo de acuerdo con la invención, grupo 1 | | | | Anticuerpo de comparación | | Anticuerpo 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 | 1,61 |
| 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 de acuerdo 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 el anticuerpo de comparación y el anticuerpo del estado de la técnica muestran claramente reacciones, por consiguiente no son específicos para P/GF libre.

La presente invención es descrita expresamente también mediante las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dade Behring Marburg GmbH

10 <120> Asociado de unión del factor de crecimiento placentario en particular hacia anticuerpos dirigidos al factor de crecimiento placentario, su producción y uso

<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>

ES 2 529 106 T3

<223> Péptido

<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

<210> 2

5 <211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

10 <400> 2

ES 2 529 106 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 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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<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

ES 2 529 106 T3

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> 4

<211> 153

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<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 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 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

ES 2 529 106 T3

<210> 5

<211> 204

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido

<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

10 <211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 529 106 T3

<223> Péptido

<400> 6

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> Péptido

10 <400> 7

ES 2 529 106 T3

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> Péptido

<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> Péptido

<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> Péptido

<400> 10

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

25

<210> 11

<211> 12

ES 2 529 106 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

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> Péptido

<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> Péptido

<400> 13

Glu Val Val Pro Phe
1 5

<210> 14

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 14

ES 2 529 106 T3

Val Val Pro Phe Gln
1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 15

Val Pro Phe Gln Glu
1 5

10 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido

<400> 16

Pro Phe Gln Glu Val
1 5

<210> 17

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 17

Phe Gln Glu Val Trp
1 5

25

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 529 106 T3

<220>

<223> Péptido

<400> 18

Gln Glu Val Trp Gly
1 5

5 <210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido

<400> 19

Glu Val Trp Gly Arg
1 5

<210> 20

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 20

Val Trp Gly Arg Ser
1 5

20

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido

<400> 21

Trp Gly Arg Ser Tyr
1 5

<210> 22

ES 2 529 106 T3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido

<400> 22

Gly Arg Ser Tyr Cys
1 5

<210> 23

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 23

Arg Ser Tyr Cys Arg
1 5

15

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido

<400> 24

Ser Tyr Cys Arg Ala
1 5

<210> 25

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

ES 2 529 106 T3

<400> 25

Tyr Cys Arg Ala Leu
1 5

<210> 26

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 26

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

10 val Glu Thr

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido

<400> 27

Gly Asp Glu Asn Leu
1 5

<210> 28

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

25 <400> 28

Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His
1 5

<210> 29

ES 2 529 106 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido

<400> 29

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

<210> 30

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 30

Gly Cys Cys Gly Asp
1 5

15

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido

<400> 31

Cys Cys Gly Asp Glu
1 5

<210> 32

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

ES 2 529 106 T3

<400> 32

Cys Gly Asp Glu Asn
1 5

<210> 33

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 33

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

10

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

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido

<400> 34

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

<210> 35

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

25 <400> 35

Gln Leu Leu Lys Ile
1 5

<210> 36

ES 2 529 106 T3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido

<400> 36

Arg Pro Ser Tyr Val
1 5

<210> 37

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 37

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

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido

<400> 38

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

<210> 39

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

ES 2 529 106 T3

<400> 39

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln
1 5

<210> 40

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 40

10

Val Glu Thr Ala Asn
1 5

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido

<400> 41

Thr Ala Asn Val Thr
1 5

<210> 42

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

25 <400> 42

Asn Val Thr Met Gln
1 5

<210> 43

<211> 12

ES 2 529 106 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

5 <400> 43

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

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 44

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

15 <210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido

<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

<211> 4

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

ES 2 529 106 T3

<400> 46

Glu Cys Arg Pro
1

<210> 47

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 47

Pro Leu Arg Glu Lys
1 5

10

<210> 48

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido

<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

Ala Val Pro Arg
35

<210> 49

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

25 <400> 49

ES 2 529 106 T3

Met Lys Pro Glu Arg
1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 50

Lys Pro Glu Arg Arg
1 5

10 <210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido

<400> 51

Leu Cys Gly Asp Ala
1 5

<210> 52

<211> 86

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 52

ES 2 529 106 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> Péptido

<400> 53

Cys Glu Cys Arg His
 1 5

10 <210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido

<400> 54

Glu Cys Arg His Ser
 1 5

<210> 55

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 529 106 T3

<220>

<223> Péptido

<400> 55

Lys Pro Leu Arg Glu
1 5

5 <210> 56

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido

<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

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 57

Gln Gln Arg Lys Pro
1 5

20

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligopéptido

<400> 58

ES 2 529 106 T3

Gln Arg Lys Pro Leu
1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 59

Arg Lys Pro Leu Arg
1 5

10 <210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Oligopéptido

<400> 60

Pro Glu Arg Arg Arg
1 5

<210> 61

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Oligopéptido

<400> 61

Glu Arg Arg Arg Pro
1 5

25

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

ES 2 529 106 T3

<213> Artificial

<220>

<223> oligopéptido

<400> 62

5

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

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Oligopéptido

<400> 63

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

15

REIVINDICACIONES

1. Péptido inmunológicamente activo que posee la información de secuencia de una isoforma primaria de P/GF que consiste en una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

IAN: 4 TFSQHVRCEC RPLREKMKPE RCGDAVPRR

5 o una parte del péptido IAN 4, donde la parte exhibe la secuencia de aminoácidos EKMKPERCGDAVP y/o MKPERCGDAVPRR.

2. Anticuerpo que es específico para P/GF libre y que se une de manera específica a un péptido según la reivindicación 1.

10 3. Anticuerpo específico según la reivindicación 2, el cual se une a un epítotope, formado de aminoácidos presentes en la siguiente secuencia de aminoácidos:

EKMKPERCGDAVP y/o MKPERCGDAVPRR.

4. Inmunoensayo para la detección de P/GF en una muestra, **caracterizado porque** se pone en contacto un anticuerpo específico según una o varias de las reivindicaciones 2-3 con la muestra y se determina de modo cualitativo o cuantitativo la formación de un inmunocomplejo con participación del P/GF.

15 5. Kit de prueba para la ejecución de un inmunoensayo según la reivindicación 4, que contiene un anticuerpo específico según una o varias de las reivindicaciones 2-3.