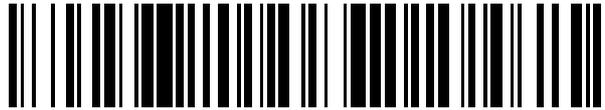


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 699**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/98 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2003 E 09005276 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2077280**

54 Título: **Anticuerpo específico de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT), su producción y uso**

30 Prioridad:

05.07.2002 DE 10230550

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

10.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ALTHAUS, HARALD

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 542 699 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo específico de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT), su producción y uso

5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales, que se unen de manera selectiva en solución acuosa a un homólogo de transferrina "transferrina deficiente en carbohidratos" (CDT), sin que ésta necesite estar unida a una fase sólida. La CDT se caracteriza porque por lo menos una de las dos cadenas de oligosacáridos, que normalmente están unidas a Asn 413 y/o Asn 611 de la transferrina, está muy ausente o esencialmente muy ausente.

10 El alcoholismo es un problema difundido mundialmente. En el pasado se desarrolló una serie de pruebas de diagnóstico para diagnosticar alcoholismo. Sin embargo, la mayoría de estas pruebas no es específica para la enfermedad. La prueba más ampliamente desarrollada hasta ahora fue introducida por Makhlouf et al. en la EP-0 605 627. Los anticuerpos allí divulgados reaccionan de manera específica con CDT, que fue encontrada en alcohólicos, pero sin embargo no en no alcohólicos. Con ello fue posible establecer un inmunoensayo, con cuya ayuda puede detectarse CDT en sueros de alcohólicos. Sin embargo, es una desventaja que en esta prueba el antígeno que va a ser detectado tiene que estar acoplado primero a una fase sólida, puesto que los anticuerpos divulgados en la EP-0 605 627 no se unen o se unen de manera insuficiente a la CDT, la cual se halla en solución.

15 Con ello, existió el objetivo de mejorar la detección de CDT, de manera que sea posible la detección directa de CDT en una muestra que se encuentra en solución y con ello omitir la necesidad del acoplamiento a una fase sólida del antígeno que va a ser detectado.

20 De manera sorprendente este objetivo fue logrado mediante el suministro de anticuerpos, que en solución acuosa se unen de manera selectiva a CDT, sin que ésta necesite estar ligada a una fase sólida. Con ayuda de experimentos de levantamiento de mapa de epitope se estableció que los anticuerpos de acuerdo con la invención, en contraposición a los anticuerpos del estado de la técnica, se ligan simultáneamente a diferentes segmentos de secuencia de la CDT. De ello se derivó que los epitopes reconocidos de los anticuerpos de acuerdo con la invención son epitopes discontinuos.

25 Con ello, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, que en solución acuosa se une de manera selectiva a CDT, sin que ésta necesite estar unida a una fase sólida. Se determinó que la unión de este anticuerpo ocurre en el ámbito de los siguientes segmentos de secuencia (1) a (4) de la CDT:

(1) WARSMGGKEDLIWELL y

(2) TTEDSIKIMNGEADAMSLDGGF y

30 (3) SKLSMGSGNLNLEPN y

(4) YEKYLGEEYVKAV,

donde es irrelevante si los péptidos están presentes unidos a una fase sólida o en solución.

En el marco de la presente invención, unión selectiva significa una unión suficientemente específica o esencialmente específica, que hace posible una clara diferenciación entre CDT por un lado y transferrina humana por otro lado.

35 En el sentido de la presente invención, el concepto "fase sólida" o "fase solidificada" abarca un objeto que consiste en un material poroso y/o no poroso, por regla general insoluble en agua y que puede exhibir las más diversas formas, como por ejemplo recipientes, tubos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, palillos, tiras, papel de filtro o de cromatografía, etc. Por regla general, la superficie de la fase sólida es hidrofílica o puede ser convertida en hidrofílica. La fase sólida puede consistir en los más diversos materiales, como por ejemplo en materiales inorgánicos y/u orgánicos, en materiales sintéticos, de ocurrencia natural y/o en materiales de ocurrencia natural modificados. Son ejemplos de materiales de fase sólida polímeros, como por ejemplo celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, poliácridamida, moléculas de dextrano entrelazadas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nylon; cerámica; vidrio; metales, en particular metales nobles como oro o plata, magnetita; mezclas o combinaciones de ellos; etc. También el concepto "fase sólida" debería involucrar 40 células, liposomas o vesículas de fosfolípidos.

La fase sólida puede exhibir un recubrimiento de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, hidratos de carbono, sustancias lipófilas, biopolímeros, polímeros orgánicos y mezclas de ellos, para suprimir o impedir por ejemplo la unión no específica de componentes de las muestras a la fase sólida o para alcanzar mejoramientos por ejemplo

respecto la estabilidad de la suspensión de fases sólidas en partículas, en la estabilidad al almacenamiento, en la estabilidad a la forma dada o la resistencia frente a la luz UV, microbios u otros agentes con efecto destructor.

5 Se prefiere el anticuerpo monoclonal, que es producido a partir de un cultivo celular, que fue inscrito ante el DSZM Deutsche Sammlung de Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschero Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania el 16 de abril de 2002 (día del ingreso de la posición de inscripción) según acuerdo de Budapest, como sigue:

Cultivo celular 98-84/011 número de ingreso: DSM ACC2540

10 También son fragmentos de acuerdo con la invención que se ligan al antígeno, por ejemplo fragmentos Fab, Fab', Fv o F(ab')₂, que pueden ser producidos a partir de los anticuerpos de acuerdo con la invención previamente mencionados, según métodos conocidos por los expertos.

15 En general, en el sentido de esta invención, bajo el concepto "anticuerpo" se entiende no sólo anticuerpos completos sino también de manera expresa fragmentos de anticuerpos, como los ya mencionados fragmentos Fab, Fv, F(ab')₂ o Fab' así como también anticuerpos quiméricos, humanizados, bi- u oligoespecíficos, o "de cadena sencilla"; además también agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas y/o sus fragmentos, en tanto se obtengan las propiedades de unión al antígeno o hapteno. Los fragmentos de anticuerpos se producen por ejemplo mediante escisión enzimática de anticuerpos con enzimas como pepsina o papaína. Los agregados, polímeros y conjugados de anticuerpos pueden ser generados mediante múltiples métodos, por ejemplo mediante tratamiento en caliente, transformación con sustancias como glutaraldehído, reacción con moléculas que se unen a la inmunoglobulina, adición de biotina a anticuerpos y subsiguiente reacción con estreptavidina o avidina, etc.

20 En el sentido de esta invención, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede haber sido producido mediante métodos comunes, por ejemplo mediante inmunización de un animal, como por ejemplo ratón, rata, conejillo de indias, conejo, caballo, oveja, cabra, perro (ver otros Messerschmid (1996) BIOforum, 11:500-502), y subsiguiente establecimiento de células de hibridoma y la subsiguiente purificación de los anticuerpos secretados; o mediante clonación y expresión de las secuencias de nucleótido o bien versiones modificadas de ellas, las cuales codifican las secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión del anticuerpo natural al antígeno y/o hapteno.

30 Además, es un objetivo de la presente invención un método para la producción del anticuerpo mediante inmunización de un animal de ensayo adecuado con transferrina no glicosilada o CDT, subsiguiente fusión de las células del bazo de este animal de ensayo con células de mieloma, donde surgen células híbridas que producen anticuerpos, y subsiguiente clonación de las células híbridas y selección de un clon de tales células híbridas, el cual produce un anticuerpo, cuya unión ocurre según los resultados de un levantamiento de mapa de epítipo en el ámbito de los siguientes fragmentos de secuencia (1) a (4) de una CDT:

(1) VVARSMGGKEDLIWELL y

(2) TTEDSIKIMNGEADAMSLDGGF y

35 (3) SKLSMGSGNLNLEPN y

(4) YEKYLGEEYVKAV;

Finalmente sigue la producción de los anticuerpos a partir del clon de células híbridas seleccionado de tal manera, según un método conocido por los expertos.

40 El método de producción previamente descrito comprende la tecnología de hibridoma conocida por todos los expertos para la producción de anticuerpos monoclonales, como fue divulgado por primera vez en el año 1975 por Köhler y Milstein y después de lo cual fue modificado o mejorado por numerosos autores. Aunque esta tecnología fue empleada frecuentemente para la producción de anticuerpos monoclonales a partir de células de ratón, existen también publicaciones que describen la producción de anticuerpos monoclonales de otro origen. Además, se han divulgado también métodos para la producción de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos humanizados o bi- u oligoespecíficos o quiméricos, que así mismo evidentemente pueden ser consultados para la producción de anticuerpos de acuerdo con la invención.

50 La presente invención se refiere también a un inmunoensayo para la detección de CDT en una muestra; al respecto, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo de acuerdo con la invención previamente descrito o un fragmento de anticuerpo correspondiente, y a continuación se determina de manera cualitativa o cuantitativa la formación de un inmunocomplejo con participación de la CDT.

Así mismo son objeto de la presente invención kits de prueba para la ejecución de un inmunoensayo previamente mencionado, que contienen un anticuerpo de acuerdo con la invención o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención.

- 5 Además, la presente invención es aclarada mediante los siguientes ejemplos. Éstos sirven exclusivamente para aclarar a modo de ejemplo aspectos individuales de la presente invención y en ningún caso se entienden como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de Sefarosa transferrina-antihumana

- 10 Para la purificación por afinidad de transferrina de sueros humanos (sueros normales y sueros de alcohólicos) se produjo un soporte de afinidad mediante acoplamiento de 120 mg de transferrina anti-humana (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) a 0,8 g de Sefarosa activada CNBr CL-4B.

- 15 Se realiza diálisis de 120 mg de transferrina anti-humana contra solución 0,1 M de NaHCO_3 . Se lavan 0,8 g de Sefarosa CL-4B (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) con solución 0,1 M de NaHCO_3 y se añaden bajo enfriamiento a 1,28 g de Bromcyan disuelto en 5 ml de acetonitrilo. Se agita la suspensión por 15 minutos a pH 11 y 4°C. A continuación se lava de manera intensa la suspensión con solución de NaHCO_3 0,1 M. Se suspende la Sefarosa activada en solución 0,1 M de NaHCO_3 y se añade a la solución de anticuerpo previamente preparada y se incuba por 6 horas a temperatura ambiente. La Sefarosa-transferrina anti-humana así producida es lavada con solución de sal de Koch con tampón de fosfato de pH 7,2 y se almacena hasta su uso en solución de sal de Koch con tampón de fosfato de pH 7,2 + 1g/L de NaN_3 .

- 20 **Ejemplo 2:** Aislamiento de transferrina humana de suero humano (suero normal y suero de alcohólico)

- 25 Para la purificación por afinidad de transferrina de suero humano se coloca en una columna de vidrio la Sefarosa transferrina anti-humana producida bajo el Ejemplo 1 y se lava con 100 ml de solución de sal de Koch con tampón de fosfato de pH 7,2 + 1 g/L NaN_3 . Se aplican a la columna 10 ml de suero humano (suero normal y suero de alcohólico) con un flujo de 0,5 ml/minuto y se eliminan las proteínas no ligadas mediante lavado de la columna con 50 ml de solución de sal de Koch con tampón de fosfato de pH 7,2 + 1 g/L NaN_3 , 50 ml de solución 1 M de NaCl y 50 ml de agua. Se realiza la elución a la transferrina ligada con 50 ml de solución 0,5 M de glicina, cuyo valor de pH fue ajustado con ácido clorhídrico a pH 2,5, se neutraliza inmediatamente mediante adición de tris(hidroximetil)-aminometano sólido y se realiza diálisis contra solución de sal de Koch con tampón de fosfato de pH 7,2 + 1g/L NaN_3 .

- 30 **Ejemplo 3:** Transferrina humana no glicosilada

a) Transferrina humana no glicosilada recombinante

La producción de transferrina no glicosilada recombinante ocurre con ayuda de métodos comunes de tecnología genética y biología molecular y es descrita en Mason et al. (1993) *Biochemistry*, 32: 5472-5479.

b) Desglicosilación enzimática de transferrina humana

- 35 Se disuelven 60 mg de transferrina humana (por ejemplo compañía Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Alemania) en 8 ml de solución de sal de Koch con tampón de fosfato de pH 7,2 con 10 mM/L de EDTA y 1g/L (p/v) de decil-sulfato de sodio (compañía Fluka, número: 71443). La solución así preparada de transferrina es calentada en el baño de agua a 37°C y se añaden 180 unidades (3 unidades / mg de transferrina) de N Glicosidasa F (compañía Roche, número: 1365193). Se incuba la carga por 17 horas en el baño de agua a 37°C. Se investiga la terminación de la desglicosilación por medio de SDS-PAGE (Duan et al (1998) *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 69: 217-224).
- 40

Ejemplo 4: Producción de anticuerpos monoclonales según el estado de la técnica

- 45 La producción de anticuerpos monoclonales según el estado de la técnica ocurrió como se describe en el documento de patente EP-0 605 627 B1 mediante inmunización con secuencias de péptidos específicas de transferrina P1 y P2. Se obtuvieron los siguientes anticuerpos híbridos / monoclonales:

Denominación del anticuerpo	Especificidad
01-32/062	anti-P1
00-177/012	anti-P1
00-187/016	anti-P2
00-187/027	anti-P2

Ejemplo 5: Producción de los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención

a) Inmunización de ratones

- 5 Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones BALB/c con en cada caso 20 µg de transferrina no glicosilada en adyuvante completo de Freund. Después de 4 semanas ocurrió una inyección de refuerzo con en cada caso 20 µg de transferrina no glicosilada en adyuvante incompleto de Freund (compañía ICN Biomedical GmbH, Eschwege, Alemania) y después de 8 semanas con en cada caso 20 µg de transferrina no glicosilada sin adyuvante de Freund. Los últimos 3 días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección de refuerzo por vía intravenosa con en cada caso 20 µg de transferrina no glicosilada.

b) Fusión

- 15 Después de la muerte de los ratones por inhalación de CO₂ se tomaron los bazo y se produjeron suspensiones de células individuales en medio Eagle Dulbeccos modificado libre de suero (DMEM, compañía CC Pro GmbH, Neustadt/W, Alemania). Se aplicó centrifugación a las células (652 g) y se lavaron 2 veces en DMEM. A continuación se determinó el número de células por medio de coloración de azul Tripano. A aproximadamente 10⁸ células de bazo se añadieron 2x10⁷ células de mieloma (Sp2/0). Después de realizar la centrifugación (360 g) se descartó el sobrenadante, se añadió 1 ml de solución de polietilenglicol (PEG 4000, compañía Merck Eurolab, Bruchsal, Alemania; aproximadamente al 50% en DMEM) a la pella de células y después de nueva suspensión se incubó por 1 minuto a 37°C. A continuación se añadieron aproximadamente 10 ml de DMEM y se incubó por 2 a 4 minutos a temperatura ambiente. Se separaron por centrifugación las células producto de la fusión (326 g) y se suspendieron nuevamente las pellas en DMEM + 20% FKS (suero fetal de ternero, compañía Biowithaker Europe, Verviers, Bélgica) + solución de HAT (compañía CC Pro GmbH, Neustadt/W, Alemania) y se colocaron en placas de cultivo celular de 24 pozos (compañía Costar). La concentración celular aproximada por pozo fue de 5x10⁴ a 5x10⁶ células.

- 25 2 - 3 semanas más tarde se tomaron las colonias formadas de células (híbridas) y se transfirieron a nuevas placas de cultivo.

c) Determinación de la especificidad de los anticuerpos

Se probó la especificidad de los anticuerpos suministrados en el cultivo celular en una primera etapa de prueba, con ayuda de placas de microtitulación recubiertas con antígeno de inmunización (compañía Nunc, tipo B), recubrimiento 1 µg/ml ≈ 0,015 µg/depresión.

- 30 En cada depresión de la placa de microtitulación se colocaron con pipeta 100 µl de sobrenadante de cultivo celular (dilución 1:2) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar dos veces la placa con solución de lavado de POD (OSEW; compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) se colocaron en cada depresión 100 µl de conjugado anti-ratón IgG/F(ab)₂-POD (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de otros dos lavados de la placa se colocaron en cada depresión 100 µl de solución Chromogen TMB (Compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) 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 (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se valoraron las placas de microtitulación en el BEP II (Behring-ELISAProzessor II, compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) a 450 nm.

- 40 En una segunda etapa de prueba se verificaron las híbridas como se describió arriba, con ayuda de placas de microtitulación (compañía Nunc, tipo B), las cuales habían sido recubiertas con transferrina humana (por ejemplo de compañía Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Alemania). Recubrimiento 1 µg/ml 0,015 µg/depresión.

En la tabla 1 se listan los resultados.

Tabla 1: Determinación de la especificidad de anticuerpos mediante evaluación de placas de microtitulación en el BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II) a 450 nm.

Denominación de híbrido	Extinción a 450 nm	
	Transferrina humana no glicosilada	Transferrina humana
98-22/026(569)	> 2,5	Negativo
98-23/07 (45)	> 2,5	Negativo
98-22/0104 (572)	1,739	Negativo
98-84/011 (1)	> 2,5	Negativo
01-102/01 (113)	> 2,5	Negativo
Leyenda: negativo = extinción (450 nm) < 0,1 DO; por dilución de los híbridos investigados ningún escalonamiento de la señal		

5 d) Clonación

Se realizó clonación a células individuales de híbridos, que producen los anticuerpos deseados (unión a transferrina humana no glicosilada aunque no a transferrina humana, con un micromanipulador (compañía Leitz, Wetzlar, Alemania). Los clones 98-84/011 y 01-102/01 así obtenidos fueron depositados el 16.04.2002 en el DSMZ Deutsche Sammlung de Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschero Weg 1 b, Braunschweig, Alemania, bajo el número de ingreso DSM ACC2540 (98-84/011) y DSM ACC2541 (01-102/01).

e) Determinación de la subclase de anticuerpos

Se determinó como IgG1 para 98-84/011 y 01-102/01 la subclase de anticuerpos 98-84/011 y 01-102/01, por medio de kit de determinación de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip™ de la compañía Boehringer Mannheim, Alemania.

15 f) Producción del anticuerpo

Para la producción de grandes cantidades de anticuerpo, se transfieren los correspondientes clones de células a un matraz de rodillo (compañía Corning Costar Alemania, Bodenheim), y se expande hasta el volumen final deseado a +37°C. Después se filtra la suspensión de cultivo en rodillo para la eliminación de las células mayores a 0,22 µm. Se concentra la solución de anticuerpos ya libre de células, sobre ultrafiltro (límite de separación 30.000 Dalton) y a continuación se purifica.

g) Purificación del anticuerpo

Se realiza intercambio de tampón de la solución obtenida de anticuerpo contra tampón de fosfato 0,14 M de pH 8,6 y se aplica sobre una columna de cromatografía llena con rProtein A Sepharose Fast Flow (compañía Amersham Pharmacia) (por cada 10 mg de anticuerpo que va a ser purificado se emplea 1 ml de rProtein A Sepharose Fast Flow). Se eliminan todos los componentes no ligados mediante lavado de la columna con tampón de fosfato 0,14 M de pH 8,6. Se realiza elución de la columna a los anticuerpos ligados con ácido cítrico 0,1 M de pH 3,0 y se realiza diálisis contra acetato de sodio 0,05 M + 0,5 M NaCl + Tris 0,05 M + azida de sodio 0,01% pH 7,0.

Ejemplo 6: Determinación de la especificidad del anticuerpo para antígeno unido a fase sólida

Se probó la especificidad del anticuerpo producido, con ayuda de a) placas de microtitulación recubiertas con transferrina no glicosilada (compañía Nunc, tipo B), recubrimiento 1 µg/ml ≈ 0,015 µg/depresión, b) placas de microtitulación recubiertas con transferrina humana (compañía Nunc, tipo B), recubrimiento 1 µg/ml ≈ 0,015

µg/depresión, c) placas de microtitulación recubiertas con péptido P1 (compañía Nunc, tipo B), recubrimiento 3 µg/ml ≈ 0,045 µg/depresión y d) placas de microtitulación recubiertas con péptido P2 (compañía Nunc, tipo B), recubrimiento 3 µg/ml ≈ 0,045 µg/depresión.

- 5 Se transfirieron con pipeta a cada depresión de la placa de microtitulación 100 µl de anticuerpo monoclonal (1 µg/ml) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar dos veces la placa con solución de lavado POD (OSEW; compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) se colocaron en cada depresión 100 µl de conjugado anti-ratón IgG/F(ab)₂-POD (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de otros dos lavados de la placa se colocaron en cada depresión 100 µl de solución Chromogen TMB (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) 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 (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se evaluaron las placas de microtitulación en el BEP II (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) a 450 nm.
- 10

En la tabla 2 se listan los resultados.

Tabla 2: Determinación de la especificidad de anticuerpo mediante valoración de placas de micro titulación en el BEP II a 450 nm

		Extinción a 450 nm			
Anticuerpo		Transferrina humana no glicosilada	Transferrina humana	Péptido 1	Péptido 2
Anticuerpo contra Transferrina no glicosilada	98-22/026	1,578	Negativa	Negativa	Negativa
	98-23/07	2,497	Negativa	Negativa	Negativa
	98-22/0104	1,179	Negativa	Negativa	Negativa
	98-84/011	>2,5	Negativa	Negativa	Negativa
	01-102/01	2,432	Negativa	Negativa	Negativa
Anticuerpo del estado de la técnica contra péptido P1	00-177/012	1,063	0,157	>2,5	Negativa
	01-32/062	>2,5	0,151	>2,5	Negativa
Anticuerpo del estado de la técnica contra péptido P2	00-187/016	2,339	Negativa	Negativa	>2,5
	00-187/027	>2,5	Negativa	Negativa	>2,5

15

Legenda: negativo = extinción_{450 nm} >0,1 DO; por dilución del híbrido investigado ningún escalonamiento de la señal

Los anticuerpos inducidos con transferrina no glicosilada muestran una reacción sólo con transferrina no glicosilada, donde los anticuerpos del estado de la técnica muestran una reacción con el respectivo péptido y transferrina no glicosilada ligada a la fase sólida.

20 **Ejemplo 7:** Determinación de la especificidad de los anticuerpos por antígenos en solución

a) Se recubrieron placas de micro titulación (compañía Nunc, tipo B), con los anticuerpos monoclonales que iban a ser comparados. Concentración de recubrimiento 1 µg/ml ≈ 0,015 µg/depresión.

- 25 En las depresiones de la placa de microtitulación se colocaron con pipeta 100 µl de una serie geométrica de dilución que comenzaba en 200 µg/ml de a) transferrina humana, b) transferrina humana desglicosilada enzimáticamente, c) transferrina humana de suero normal y d) transferrina humana de suero de alcohólico y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar dos veces la placa con solución de lavado POD (OSEW; compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) se colocaron en cada depresión 100 µl de conjugado de transferrina anti-humana-POD (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar dos veces

más la placa, se colocaron en cada depresión 100 μ l de solución Chromogen TMB (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se incubó por otros 30 minutos a +15 a +25°C. Después de la incubación se colocaron en cada depresión 100 μ l de solución de detención POD (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se evaluó la placa de microtitulación en el BEP II (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) a 450 nm.

- 5 En las tablas 3.1 y 3.2 se listan los resultados.

Tabla 3.1: Determinación de la reactividad mediante evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm

Extinción a 450 nm																
Antígeno	Conc. [µg/ml]	Anticuerpo contra transferrina glicosilada			Anticuerpo según el estado de la técnica			Antígeno	Conc. [µg/ml]	Anticuerpo contra transferrina glicosilada			Anticuerpo según el estado de la técnica			
		98-23/07	98-84/01	01-102/0	03-32/06	00-187/01	00-187/02			98-23/07	98-84/01	01-102/0	01-32/06	00-187/01	00-187/02	
Transferina humana	200	1,790	2,5	0,137	Neg.	0,508	0,553	200	2,500	1,773	0,388	2,500	2,500	0,320	0,442	0,588
	100	0,664	2,5	Neg.	Neg.	0,230	0,291	100	2,500	1,582	0,262	2,193	2,500	0,233	0,320	0,442
	50	0,541	2,5	Neg.	Neg.	0,123	0,170	50	2,500	1,570	0,160	1,406	2,133	0,133	0,183	0,233
	25	0,491	2,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	25	2,500	1,601	0,104	0,714	1,134	0,080	0,104	0,134
	12,5	0,320	2,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	12,5	2,500	1,274	Neg.	0,442	0,588	0,233	0,320	0,442
	6,25	0,158	2,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	6,25	2,500	1,238	Neg.	0,233	0,320	0,133	0,183	0,233
	3,125	Neg.	1,880	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	3,125	2,500	1,230	Neg.	0,133	0,183	0,233	0,320	0,442
	1,56	Neg.	0,604	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	1,56	2,500	0,880	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	0,781	Neg.	0,407	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	0,781	2,500	0,890	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	0,391	Neg.	0,284	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	0,391	2,500	0,722	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	0,195	Neg.	0,169	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	0,195	2,500	0,436	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Neg.: Extinción (450 nm) < 0,1 DO

Pos.: Extinción (450 nm) ≥ 0,1 DO

Extinción a 450 nm

Tabla 3.2: Determinación de la reactividad mediante evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm					
Antígeno	Conc. [µg/ml]	Anticuerpo contra transferrina glicosilada	Anticuerpo contra no glicosilada	Anticuerpo según el estado de la técnica	Anticuerpo según el estado de la técnica
Transferina humana	200	0,309	0,188	0,142	0,192
	100	0,229	0,116	Neg.	0,158
	50	0,177	Neg.	Neg.	0,111
	25	0,141	Neg.	Neg.	Neg.
	12,5	0,100	Neg.	Neg.	Neg.
	6,25	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	3,125	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
1,56	Neg.	1,234	Neg.	Neg.	Neg.
0,781	Neg.	0,745	Neg.	Neg.	Neg.
0,391	Neg.	0,450	Neg.	Neg.	Neg.
0,195	Neg.	0,245	Neg.	Neg.	Neg.
Neg. : Extinción (450 nm) < 0,1 DO					
Pos. : Extinción (450 nm) ≥ 0,1 DO					

b) Se recubrieron placas de microtitulación (compañía Nunc, tipo B), con los anticuerpos monoclonales. Concentración de recubrimiento 3 µg/ml ≈ 0,045 µg/depresión.

- 5 Se colocaron con pipeta en las depresiones de la placa de microtitulación, 100 µl de una serie geométrica de dilución que comenzaba en una dilución 1:10 de a) suero normal y b) suero de alcohólico, y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar dos veces la placa con solución de lavado POD (OSEW; compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) se colocaron en cada depresión 100 µl de conjugado de transferrina anti-humana-POD (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se incubó por 1 hora a +15 a +25°C. Después de lavar otras dos veces la placa se colocaron en cada depresión 100 µl de solución Chromogen TMB (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) 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 (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) y se evaluó la placa de microtitulación en el BEP II (compañía Dade Behring, Marburg, Alemania) a 450 nm.

En la tabla 4 se listan los resultados.

Tabla 4: Determinación de la reactividad mediante la evaluación de las placas de microtitulación en el BEP II a 450 nm																	
		Extinción a 450 nm															
Antígeno	Dilución	Anticuerpo contra transferrina no glicosilada						Anticuerpo según el estado de la técnica	Antígeno	Dilución	Anticuerpo contra transferrina no glicosilada						Anticuerpo según el estado de la técnica
		98-23/07	98-22/0104	98-84/011	01-102/01	01-32/062	00-187/016				98-23/07	98-22/0104	98-84/011	01-102/01	01-32/062	00-187/016	
Suero humano normal	1:10	0,318	0,512	2,5	0,150	Neg.	Neg.	Suero humano alcohólico	1:10	0,603	0,861	2,5	0,220	Neg.	Neg.		
	1:20	0,212	0,313	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		1:20	0,367	0,545	2,5	0,148	Neg.	Neg.		
	1:40	0,146	0,193	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		1:40	0,259	0,391	2,5	0,103	Neg.	Neg.		
	1:80	0,107	0,104	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		1:80	0,165	0,205	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		
	1:160	Neg.	Neg.	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		1:160	0,128	0,155	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		
	1:320	Neg.	Neg.	1,605	Neg.	Neg.	Neg.		1:320	0,110	0,118	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		
	1:640	Neg.	Neg.	0,936	Neg.	Neg.	Neg.		1:640	Neg.	Neg.	2,5	Neg.	Neg.	Neg.		

Neg. : Extinción (450 nm) < 0,1 DO

- 15 Pos.: Extinción (450 nm) ≥ 0,1 DO

Los anticuerpos dirigidos contra la transferrina no glicosilada hacen posible una clara diferenciación entre transferrina (en el suero normal) y CDT (en el suero de alcohólico), donde los anticuerpos del estado de la técnica no muestran reacción con ninguno de los dos sueros.

Ejemplo 8: Levantamiento del mapa del epítipo

- 20 Se realizó un examen sistemático de barrido de péptidos que se solapan, los cuales se derivaban de la secuencia de transferrina humana (péptidos de 13 unidades, 11 aminoácidos que se solapaban), con ayuda de la tecnología de síntesis SPOT. En: Wenschuh, H. et al. (2000) Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and

screening of bioactive peptides, Biopolymers (Peptide Science), 55:188-206 se describen los métodos. Los péptidos fueron acoplados por el C terminal a un soporte de celulosa y portan en el extremo N una señal de reactividad. Después de la escisión de los péptidos de SPOTs punzonados (placas de microtitulación de 96 pozos) ellos fueron acoplados a chips de vidrio activados. El protocolo de incubación para estos chips de vidrio transcurrió como sigue:

- 5 Anticuerpos monoclonales según el estado de la técnica
- Igualación en tampón de TBS, pH 8.0
 - 2 h en tampón de bloqueo, pH 8.0
 - 2 h de incubación de anticuerpos (3 µg/ml) en tampón de bloqueo, pH 8.0
 - lavado con TBS (Tween 20 al 0.05%)

- 10
- 2 h de incubación con anti-ratón-IgG-POD en tampón de bloqueo, pH 8.0
 - 3 lavados de 5 min con TBS (Tween 20 al 0.05%)
 - detección por medio de quimioluminiscencia (Lumi-Imager), Roche Diagnostics)

Anticuerpo de acuerdo con la invención 98-84/011

- nivelación en tampón de TBS, pH 8.0
- 15
- 2 h en tampón de bloqueo, pH 8.0
 - 2 h de incubación de anticuerpo (3 µg/ml) en tampón de bloqueo, pH 8.0
 - 3 lavados de 5 min con TBS (Tween 20 al 0.05%)
 - detección por medio de quimioluminiscencia (Lumi-Imager), Roche Diagnostics)

- 20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención fueron marcados directamente con peroxidasa. El método es descrito en la literatura: Wilson, M. B. y Nakane, P. K. (1978) Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, en: Immunofluorescence and Related Staining Techniques (Eds.: Knapp, W.; Holubar, K.; Wick, G.) pp. 215-224.

Después de la evaluación de la investigación surgen para los anticuerpos según el estado de la técnica los siguientes péptidos ligantes:

- 25 Anticuerpo del estado de la técnica contra péptido 1

1. **VLAENYNKSDNCE**
2. **AENYNKSDNCEDT**
3. **NYNKSDNCEDTPE**
4. **NKSDNCEDTPEAG**

- 30 Anticuerpo del estado de la técnica contra péptido 2

1. **VHKILRQQHLFG**
2. **KILRQQHLFGSN**
3. **LRQQHLFGSNVT**
4. **QQHLFGSNVTDC**

5. **QHLFGSNVTDCSG**

Las secuencias reconocidas son idénticas a los péptidos usados para la inmunización.

El anticuerpo de acuerdo con la invención 98-84/011 reacciona con cuatro segmentos de secuencia dominantes:

- 5 1. VVAR**SMGGKEDLI**
- 2. AR**SMGGKEDLIWE**
- 3. **SMGGKEDLIWELL**

- 10 4. TTEDSI**AKIMNGE**
- 5. SI**AKIMNGEADAM**
- 6. AK**IMNGEADAMSL**
- 7. TM**NGEADAMSLDG**
- 8. **NGEADAMSLDGGF**

- 15 9. SKL**SMGSGNLNLS**
- 10. L**SMGSGNLNLS**EPN

- 11. YEKYL**GEEYVKAV**

Los ámbitos 1. – 3. se encuentra en el dominio terminal en N de la transferrina, mientras que los ámbitos 4. - 8., 9. - 10. y 11. están en el dominio terminal en C y representan un epítope discontinuo.

20 LISTADO DE SECUENCIA

<110> Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

<120> Anticuerpo específico de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT), su producción y uso

<130> 2002P59001EP 01

<150> 0301134.4 <151> 2003-05-19

25 <160> 4

<170> Versión de patente 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 1

Val Val Ala Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu
1 5 10 15

Leu

<210> 2

<211> 23

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 542 699 T3

Thr Thr Glu Asp Ser Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala
1 5 10 15

Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe
20

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Lys Leu Ser Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Ser Glu Pro Asn
1 5 10 15

<210> 4

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal, producido mediante inmunización de un animal de ensayo adecuado no humano, con transferrina deficiente en carbohidratos o transferrina no glicosilada (CDT) y el establecimiento de células de hibridoma, las cuales se unen de manera selectiva en solución acuosa a CDT, sin que éstas necesiten estar ligadas a una fase sólida y cuya unión ocurre en el ámbito de los siguientes segmentos de secuencia (1) a (4) de la CDT:
- 5
- (1) VVARSMGGKEDLIWELL y
 - (2) TTEDSIAKIMNGEADAMSLDGGF y
 - (3) SKLSMGSGNLNLEPN y
 - (4) YEKYLGEEYVKAV.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, **caracterizado porque** él es producido del cultivo celular con el número de depósito DSM ACC2540.
3. Fragmento que se liga al antígeno de un anticuerpo según una de las reivindicaciones precedentes 1 o 2, el cual exhibe la misma especificidad de antígeno que el anticuerpo definido en una de estas reivindicaciones.
- 15 4. Método para la producción del anticuerpo según la reivindicación 1, mediante inmunización de un animal de ensayo no humano adecuado, con transferrina no glicosilada o CDT, fusión de las células del bazo de este animal de ensayo con células de mieloma, donde surgen células híbridas que producen anticuerpos, clonación de las células híbridas y selección de un clon tal de células híbridas, el cual produce anticuerpo, el cual se une de manera selectiva en solución acuosa a CDT y cuya unión ocurre en el ámbito de los siguientes fragmentos de secuencia (1) a (4) de la CDT:
- 20
- (1) VVARSMGGKEDLIWELL y
 - (2) TTEDSIAKIMNGEADAMSLDGGF y
 - (3) SKLSMGSGNLNLEPN y
 - (4) YEKYLGEEYVKAV.
- 25 5. Inmunoensayo para la detección de CDT en una muestra, caracterizado porque se pone en contacto con la muestra un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 o 2 o el fragmento que se une a un antígeno según la reivindicación 3 y se determina de manera cualitativa o cuantitativa la formación de un inmunocomplejo que involucra la CDT.
6. Kit de prueba para la ejecución de un inmunoensayo según la reivindicación 5 que contiene un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 o 2 o el fragmento que se une a un antígeno según la reivindicación 3.