

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 984**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009 E 09809922 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2330128**

54 Título: **Anticuerpo anticomplejo heparina/FP4 modificado y patrón de anticuerpo TIH**

30 Prioridad:

27.08.2008 JP 2008218801

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

01.03.2016

73 Titular/es:

LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-8517, JP

72 Inventor/es:

HOSHINO, NOBUHIRO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 561 984 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 anticomplejo heparina/FP4 modificado y patrón de anticuerpo TIH

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un patrón de anticuerpo TIH, caracterizado por el ligamiento de una IgG humana o un fragmento Fc de la misma, mediante un agente reticulante, para modificar proteínas, a un anticuerpo monoclonal obtenido mediante inmunización de un animal no humano con un complejo heparina/FP4, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona con el complejo heparina/FP4, y reacciona con FP4 solo, y en el que el patrón de anticuerpo TIH reacciona con el complejo heparina/FP4, pero no reacciona con FP4. Mediante dicho procedimiento, puede suministrarse de forma constante un patrón de anticuerpo TIH (trombocitopenia inducida por heparina), el cual se usa para medir un anticuerpo TIH en el ensayo de TIH. Por tanto, la presente invención se refiere además con un procedimiento de medición cuantitativa de un anticuerpo TIH en el que se prepara un patrón de anticuerpo TIH de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el cual se usa después como el patrón de anticuerpo TIH en dicho procedimiento.

Técnica anterior

15 La heparina, que es un anticoagulante, se usa para evitar la coagulación de la sangre durante el tratamiento de la tromboembolia o de la coagulación intravascular diseminada (CID), la diálisis, o la circulación extracorpórea.

Sin embargo, se sabe que la administración de heparina a veces causa TIH (trombocitopenia inducida por heparina), y se considera que el factor responsable es la generación de un autoanticuerpo (anticuerpo TIH) contra el factor plaquetario 4 (FP4), al cual se une la heparina. El diagnóstico de la TIH se lleva a cabo mediante la medición de la producción del anticuerpo TIH. Más particularmente, el anticuerpo TIH reacciona fuertemente con heparina/FP4, pero apenas reacciona con FP4 y, por tanto, se conoce un procedimiento de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo inmunoenzimático) en el cual se hace reaccionar una muestra de plasma humano con un complejo heparina/FP4 inmovilizado sobre una placa, seguido de un anticuerpo antiinmunoglobulina humana marcado enzimáticamente, y se lleva a cabo una reacción enzimática para determinar la presencia o ausencia del anticuerpo TIH (referencias que no son patentes 1 a 3).

Sin embargo, el anticuerpo TIH contenido en las muestras se mide de una forma meramente cualitativa o semicuantitativa mediante la absorbancia (valor de DO) en estas referencias.

Lista de referencias**Bibliografía que no de patentes**

30 [Bibliografía no de patente 1] Thrombosis and Haemostasis, Alemania, 1992, Vol. 68, n° 1, págs. 95-96
[Bibliografía no de patente 2] Thrombosis and Haemostasis, Alemania, 1994, Vol. 71, n° 2, págs. 247-251
[Bibliografía no de patente 3] Thrombosis and Haemostasis, Alemania, 1995, Vol. 73, n° 1, págs. 21-28

Sumario de la invención**Problema técnico**

35 El presente inventor consideró que era importante para la mejoría de la eficacia del tratamiento de la TIH medir cuantitativamente el anticuerpo TIH contenido en una muestra. El presente inventor consideró, además, que era importante medir cuantitativamente la cantidad de complejo heparina/FP4, un factor de inicio de la TIH, sin la influencia de la presencia de FP4.

Más particularmente, la medición cuantitativa del anticuerpo TIH contenido en una muestra necesita una sustancia patrón que tenga reactividades similares a las del anticuerpo TIH. Sin embargo, como el anticuerpo TIH es un autoanticuerpo producido en un ser humano, se utilizó simplemente bien (1) un anticuerpo TIH extraído de sujetos humanos (pacientes con TIH), o bien (2) un anticuerpo anticomplejo heparina/FP4 obtenido mediante la inmunización de un animal con el complejo heparina/FP4 (utilizando la reactividad cruzada frente a inmunoglobulinas humanas) como la sustancia patrón para reactivo de medición. Con respecto a (1), como se usa material humano (pacientes con TIH), se plantean varios problemas tales como restricciones éticas, límites cuantitativos, y garantías de calidad y, por tanto, el uso práctico es imposible. Con respecto a (2), los anticuerpos obtenidos mediante inmunización de un animal con el antígeno solían reaccionar tanto con el complejo heparina/FP4 como con FP4, o sea, que estos anticuerpos no eran patrones específicos para el complejo heparina/FP4. A este respecto, hay una referencia (G. M. Arepally y cols., Blood, 95(5), 1533-1540, 2000; documento US-6964854-B1) en la que se publica que se obtuvo un anticuerpo monoclonal de ratón que se unía débilmente a FP4 y se unía fuertemente al complejo heparina/FP4, pero había una pequeña posibilidad de obtener este anticuerpo monoclonal y, por tanto, no todos los proveedores podían obtenerlo. Además, en el caso de (2), se considere que a veces no hay correlación con las muestras, porque la medición se lleva a cabo usando reactividad cruzada con las inmunoglobulinas humanas.

El presente inventor ha llevado a cabo estudios exhaustivos para solucionar los problemas mencionados anteriormente, y ha encontrado que puede prepararse fácilmente un anticuerpo modificado que no reacciona con FP4, pero reacciona con el complejo heparina/FP4, mediante el uso de un anticuerpo obtenido mediante inmunización de un animal con el complejo heparina/FP4, cuya disponibilidad es relativamente fácil, y que el anticuerpo modificado puede usarse como un patrón de anticuerpo TIH específico para el complejo heparina/FP4.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo modificado que no reacciona con FP4, pero reacciona con el complejo heparina/FP4 y que puede usarse como un patrón de anticuerpo TIH específico para el complejo heparina/FP4.

Solución al problema

El inventor inmunizó a un ratón con el complejo heparina/FP4, y usó células de hibridoma preparadas a partir de células de bazo del ratón y de células de mieloma para obtener anticuerpos monoclonales de ratón según un procedimiento convencional. Estos anticuerpos monoclonales reaccionaban con el complejo heparina/FP4, pero también reaccionaban con FP4 solo con una reactividad de alrededor del 80 %. A continuación, se ligó IgG humana o su fracción Fc (fracción IgG-Fc) a cada uno de los anticuerpos monoclonales de ratón usando un agente reticulante, y se estudió la reactividad del mismo contra FP4 o el complejo heparina/FP4. Como resultado, se encontró inesperadamente que la reactividad contra FP4 solo descendió notablemente, mientras que la reactividad contra el complejo heparina/FP4 se mantuvo. A partir de estos hallazgos, el inventor encontró que puede usarse un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana o un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana como patrón de anticuerpo TIH, el cual tiene reactividades similares frente al anticuerpo humano antiheparina/FP4 (anticuerpo TIH) y el cual puede usarse en la medición cuantitativa del anticuerpo TIH, y completó la presente invención. La presente invención proporciona los siguientes (1) y (2).

(1) Un procedimiento de preparación de un patrón de anticuerpo TIH, caracterizado por el ligamiento de una IgG humana o un fragmento Fc de la misma, mediante un agente reticulante para modificar proteínas, a un anticuerpo monoclonal obtenido mediante inmunización de un animal no humano con un complejo heparina/FP4, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona con el complejo heparina/FP4, y reacciona con FP4 solo, y en el que el patrón de anticuerpo TIH reacciona con el complejo heparina/FP4, pero no reacciona con FP4.

(2) Un procedimiento de medición cuantitativa de un anticuerpo TIH contenido en una muestra, caracterizado por la preparación de un patrón de anticuerpo TIH de acuerdo con el procedimiento de (1) y el uso de dicho patrón de anticuerpo TIH en dicho procedimiento.

La expresión "anticuerpo TIH" tal como se usa en el presente documento significa un autoanticuerpo que se produce en un ser humano, y que reacciona fuertemente con el complejo heparina/FP4, pero apenas reacciona con FP4 solo.

La expresión "anticuerpo anticomplejo heparina/FP4" se usa para querer decir un anticuerpo que reacciona con el complejo heparina/FP4, independientemente de su origen o de la reactividad frente a FP4 solo, a menos que se especifique de otra forma. Más particularmente, los "anticuerpos anticomplejo heparina/FP4" incluyen, por ejemplo, un anticuerpo que reacciona con FP4 solo, un anticuerpo que no reacciona con FP4 solo, un autoanticuerpo producido en un ser humano (por ejemplo, el anticuerpo TIH), y un anticuerpo obtenido mediante la inmunización de un animal no humano, siempre y cuando reaccionen fuertemente con el complejo heparina/FP4,

Efectos ventajosos de la invención

El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite proporcionar un anticuerpo modificado que no reacciona con FP4, pero reacciona con el complejo heparina/FP4, y el cual puede usarse como un patrón de anticuerpo TIH que está disponible fácilmente y, muestra una buena repetibilidad de forma sistemática. Además, se proporciona un procedimiento de medición cuantitativa de un anticuerpo TIH mediante la preparación de un patrón de anticuerpo TIH de acuerdo con el procedimiento de la presente invención y el uso de dicho patrón de anticuerpo TIH en dicho procedimiento.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es un cromatograma que muestra el patrón de fraccionamiento de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana mediante HPLC por filtración en gel.

La fig. 2 es un cromatograma que muestra el patrón de fraccionamiento de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana mediante HPLC por filtración en gel.

La fig. 3 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana (5A1) contra una placa de complejo heparina/Fp4 o una placa de FP4.

La fig. 4 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/Fp4 ligado a la fracción IgG-Fc humana (5A1) contra una placa de complejo heparina/Fp4 o una placa de FP4.

La fig. 5 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana (2D6B) contra una placa de complejo heparina/Fp4 o una placa de FP4.

La fig. 6 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana (10E6) contra una placa de complejo heparina/Fp4 o una placa de FP4.

La fig. 7 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 (5A1) contra una placa de complejo heparina/FP4 o una placa de FP4.

La fig. 8 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 (2D6B) contra una placa de complejo heparina/FP4 o una placa de FP4.

5 La fig. 9 es una gráfica que muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 (10E6) contra una placa de complejo heparina/FP4 o una placa de FP4.

La fig. 10 es una gráfica que muestra una curva patrón construida usando el patrón de anticuerpo TIH descrito en el presente documento.

Descripción de realizaciones

10 (1) Preparación del complejo heparina/FP4

El factor plaquetario 4 (FP4) es una proteína que tiene un peso molecular de 31.000, la cual es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades, que tienen cada una un peso molecular de 7.800. La heparina y el FP4 forman complejos a diversas proporciones *in vivo*, pero se considera que la proporción óptima es un complejo compuesto por dos moléculas de FP4 y una molécula de heparina, porque la carga eléctrica se neutraliza. El complejo heparina/FP4 usado en la preparación del anticuerpo modificado de la presente invención puede prepararse mediante la mezcla de heparina con FP4 purificado a partir de plaquetas humanas, o según procedimientos conocidos tales como un procedimiento conocido de preparación de proteína recombinante o un procedimiento de expresión de proteína de fusión, como se describe en el ejemplo 1 de más adelante. A este respecto, el tipo de heparina o una modificación parcial en la secuencia de aminoácido de FP4 no está limitado, siempre y cuando dicha proteína recombinante o de fusión tenga propiedades similares a las de los complejos heparina/FP4 presentes *in vivo*. Las propiedades similares a las de los complejos heparina/FP4 presentes *in vivo* significan, por ejemplo, que un anticuerpo TIH producido en un paciente con TIH muestra una reactividad contra el complejo heparina/FP4 preparado similar a la reactividad mostrada contra los complejos heparina/FP4 presentes *in vivo*.

25 El FP4 puede prepararse mediante el uso de un procedimiento conocido de preparación de proteína recombinante, y puede seleccionarse apropiadamente un anfitrión de entre, por ejemplo, *E. coli*, levaduras, células de insecto, un gusano de seda, y células animales.

La heparina usada puede seleccionarse apropiadamente de entre, por ejemplo, heparina sin fraccionar, una fracción de heparina de alto peso molecular, y una fracción de heparina de bajo peso molecular,

(2) Preparación de anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4

30 Un anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 que puede usarse en la presente invención puede obtenerse mediante, por ejemplo, un procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal usando un hibridoma preparado mediante un procedimiento conocido de fusión celular. Puede seleccionarse una célula productora de anticuerpo de entre animales distintos de un ser humano, por ejemplo, un ratón, una rata, o un cobaya. Más particularmente, se usa un complejo heparina/FP4 como un antígeno, y se lleva a cabo un cribado usando este complejo heparina/FP4 para preparar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que puede usarse en la presente invención. El anticuerpo monoclonal de interés puede prepararse a partir del hibridoma obtenido. Los hibridomas y los anticuerpos monoclonales pueden prepararse según procedimientos convencionales, como se describe en, por ejemplo, Zoku Seikagaku Jikken Koza, editado por la Sociedad Japonesa de Bioquímica, o Meneki Seikagaku Kenkyu Ho, editado por la Sociedad Japonesa de Bioquímica.

40 El anticuerpo monoclonal deseado puede prepararse mediante el cultivo de células de hibridoma (por ejemplo, hibridoma de ratón) que producen el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, en un medio apropiado o en la cavidad abdominal de un mamífero tal como un ratón. Los hibridomas pueden prepararse generalmente mediante, por ejemplo, fusión celular de células de bazo de un mamífero tal como un ratón o un ave inmunizados con un complejo heparina/FP4, con células de mieloma de un mamífero a tal como un ratón, según el procedimiento descrito en Nature, Vol. 256, pág. 495 (1975) Más particularmente, la preparación puede llevarse a cabo según los procedimientos descritos en los ejemplos de más adelante.

El medio que puede usarse en el cultivo del hibridoma no está limitado, siempre y cuando sea adecuado para el cultivo de hibridomas. Preferentemente, puede usarse un medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (al que de aquí en adelante se hará referencia como DME) complementado con suero bovino fetal, L-glutamina, L-piruvato, y antibióticos (penicilina G y estreptomycin). En el caso de que el cultivo se lleve a cabo en un medio, el hibridoma se cultiva, por ejemplo, a 37°C en CO₂ al 5 % durante alrededor de 3 días. En el caso de que el cultivo se lleve a cabo en la cavidad abdominal de un ratón, el hibridoma se cultiva, por ejemplo, durante alrededor de 14 días.

El anticuerpo monoclonal de interés puede separarse y purificarse del caldo de cultivo o la ascitis de mamífero anteriormente preparados mediante, por ejemplo, un procedimiento de uso común para el aislamiento y purificación de proteínas. Ejemplos del procedimiento incluyen precipitación salina con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico usando celulosa de intercambio iónico, cromatografía en columna por tamiz molecular usando un gel de tamiz molecular, cromatografía de afinidad en columna usando polisacáridos de unión a proteína A, diálisis, y liofilización.

El "anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4" que puede usarse en la presente invención incluye un fragmento de anticuerpo. El fragmento de anticuerpo es un fragmento que procede del anticuerpo monoclonal deseado, y que tiene la misma reactividad que el anticuerpo monoclonal original. Ejemplos del fragmento de anticuerpo de la presente invención incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la digestión del anticuerpo monoclonal original con una proteasa según un procedimiento convencional, y la realización de un procedimiento convencional para la separación y purificación de proteínas.

(3) Preparación de anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a IgG humana y de anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a un fragmento procedente de IgG humana

La IgG humana usada en la presente invención puede adquirirse de AbD Serotec o similar. Un fragmento de anticuerpo procedente de IgG humana puede adquirirse de BETHYL o similar, o puede prepararse de una forma similar a la descrita con respecto al fragmento de anticuerpo en la sección anterior (2). La IgG humana puede purificarse a partir de un suero humano mediante un procedimiento conocido.

El fragmento de anticuerpo procedente de IgG humana usado en la presente invención puede seleccionarse, independientemente de si tiene o no la misma reactividad que la IgG humana original. El fragmento de anticuerpo puede ser, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, o Fv.

El componente de IgG humana que puede usarse en la presente invención y que se liga al anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 puede seleccionarse apropiadamente de entre el total de IgG humanas y fragmentos de anticuerpo (Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Fv, o similar) procedentes de IgG humana, preferentemente el total de IgG humanas, una fracción Fc procedente de IgG humana, o una fracción Fab procedente de IgG humana. A veces en el presente documento se hace referencia a la fracción Fc procedente de IgG humana como la fracción IgG-Fc humana.

El ligamiento de la IgG humana o de un fragmento de anticuerpo procedente de IgG humana a un anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 puede llevarse a cabo mediante la selección apropiada de un procedimiento de unión y de las condiciones de unión según un procedimiento convencional, siempre y cuando sea un procedimiento para ligar una proteína a otra. En particular, se usa un agente reticulante para modificar proteínas. Ejemplos del agente reticulante incluyen glutarato de disuccinimido, que tiene grupos succinimida en ambos extremos, o sus análogos; bismaleimida trietilenglicol, que tiene grupos maleimida en ambos extremos, sus análogos; éster de maleimidacaprolil oxisuccinimida, que tiene ambos grupos en sus extremos, o sus análogos; o glutaraldehído.

(4) Evaluación del anticuerpo modificado o patrón de anticuerpo TIH

Con respecto a los anticuerpos modificados anteriormente preparados (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a IgG humana o anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a un fragmento procedente de IgG humana), puede llevarse a cabo una confirmación de que reacciona con el complejo heparina/FP4, pero no reacciona con FP4, o una evaluación de si puede usarse o no como patrón de anticuerpo TIH, mediante la medición de su reactividad contra el complejo heparina/FP4 y de su reactividad contra FP4, y el estudio de si muestra o no las mismas reactividades que el anticuerpo TIH presente *in vivo*. Por ejemplo, según los procedimientos descritos en los ejemplos 5 y 6, se preparan una placa de complejo heparina/FP4 y una placa de FP4, y se determina la reactividad del anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a IgG humana o del anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a un fragmento procedente de IgG humana frente a cada una de estas placas. Cuando el anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 original, que muestra las mismas reactividades contra ambas placas, se liga a IgG humana o a un fragmento procedente de IgG humana, se estudia si se mantiene o no su reactividad contra la placa de complejo heparina/FP4, pero su reactividad contra la placa FP4 desciende de forma notable, es decir, muestra una baja reactividad, similar a la del anticuerpo TIH presente *in vivo*.

Además, el anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a IgG humana o el anticuerpo monoclonal anticomplejo heparina/FP4 ligado a un fragmento procedente de IgG humana se diluyen para preparar muestras que tengan diferentes concentraciones, y se estudia si puede construirse o no una curva patrón. Dicha curva patrón puede prepararse usando un procedimiento conocido, por ejemplo, según una aproximación terciaria de Microsoft Excel, una aproximación segmentaria o similar.

Pueden usarse como un patrón de anticuerpo TIH anticuerpos modificados apropiados seleccionados usando los estudios anteriores.

(5) Procedimiento de medición cuantitativa de anticuerpo TIH en la muestra usando patrón de anticuerpo TIH

Como un procedimiento de medición cuantitativa de un anticuerpo TIH contenido en una muestra, puede usarse un procedimiento inmunológico de medición conocido. Ejemplos del procedimiento inmunológico de medición incluyen un procedimiento de ELISA, un procedimiento de RIA, inmunoaglutinación, e inmunocromatografía.

El procedimiento de ELISA puede llevarse a cabo de la forma siguiente. El complejo heparina/FP4 se inmoviliza sobre un vehículo insoluble. El complejo heparina/FP4 inmovilizado se pone en contacto con una muestra para analizar, o un conjunto de diluciones que tienen diferentes concentraciones, preparadas a partir del patrón de anticuerpo TIH, seguido de un anticuerpo para la detección, preparado mediante conjugación de un anticuerpo antiinmunoglobulina humana o de su fragmento de anticuerpo con un marcador. Puede detectarse una señal del marcador del anticuerpo para la detección, el cual se une al complejo heparina/FP4 inmovilizado mediante un anticuerpo TIH contenido en la muestra. A continuación, se construye una curva patrón basada en los valores medidos para las diluciones que tienen diferentes concentraciones, preparadas a partir del patrón de anticuerpo TIH. La curva patrón y el valor medido de la muestra se usan para calcular la concentración del anticuerpo TIH contenido en la muestra.

El procedimiento de inmunoaglutinación puede llevarse a cabo de la forma siguiente. El complejo heparina/FP4 y un anticuerpo antiinmunoglobulina humana o su fragmento de anticuerpo se inmovilizan por separado sobre un vehículo insoluble. El complejo heparina/FP4 inmovilizado o el anticuerpo antiinmunoglobulina humana inmovilizado o su fragmento de anticuerpo se pone en contacto con una muestra para analizar, o un conjunto de diluciones que tienen diferentes concentraciones, preparadas a partir del patrón de anticuerpo TIH de la presente invención. Se lleva a cabo la aglutinación con el anticuerpo TIH contenido en la muestra, y puede detectarse el grado de aglutinación. A continuación, se construye una curva patrón basada en los valores medidos para las diluciones que tienen diferentes concentraciones, preparadas a partir del patrón de anticuerpo TIH de la presente invención. La curva patrón y el valor medido de la muestra se usan para calcular la concentración del anticuerpo TIH contenido en la muestra.

La curva patrón basada en el patrón de anticuerpo TIH puede construirse de forma simultánea con la medición de la muestra, o de forma separada, a partir de la medición y puede consultarse.

Como se ha descrito anteriormente, el patrón de anticuerpo TIH puede usarse para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la medición cuantitativa de un anticuerpo TIH en una muestra. Las muestras que pueden analizarse mediante el procedimiento de la presente invención para medir de forma cuantitativa un anticuerpo TIH no están particularmente limitadas, siempre y cuando, sean el patrón de antígeno TIH preparado según el procedimiento de la presente invención, cuya concentración se conoce, o una muestra sospechosa de contener un anticuerpo TIH. Ejemplos de la muestra incluyen muestras biológicas tales como sangre, plasma, suero, y orina, preferentemente plasma o suero.

El vehículo insoluble que puede usarse en el procedimiento de análisis inmunológico de la presente invención utilizando un procedimiento de ELISA no está particularmente limitado. Ejemplos del vehículo insoluble incluyen polímeros (por ejemplo, polietileno, poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliéster, poliacrilonitrilo, fluororresinas, dextrano reticulado, y polisacáridos), nitrocelulosa, papeles, y agarosa, y combinaciones de los mismos.

Como sustancia de marcaje, puede usarse una enzima, una sustancia fluorescente, o una sustancia luminiscente. Ejemplos de la enzima incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa, y β -D-galactosidasa. Ejemplos de la sustancia fluorescente incluyen isotiocianato de fluoresceína. Ejemplos de la sustancia luminiscente incluyen ésteres de acridinio y luciferina.

El vehículo insoluble que puede usarse en el procedimiento de análisis inmunológico de la presente invención utilizando una reacción de aglutinación puede ser cualquier vehículo insoluble que se usa generalmente en un procedimiento de análisis inmunológico utilizando la reacción de aglutinación de la reacción antígeno-anticuerpo, tal como partículas de látex (en particular, partícula de látex poliestireno). Puede inmovilizarse un anticuerpo monoclonal sobre el vehículo insoluble mediante un procedimiento conocido, tal como un procedimiento de aglomeración química (usando glutaraldehído de carbodiimida, o similar como agente reticulante) o adsorción física. Puede formarse un complejo de un anticuerpo monoclonal y el vehículo insoluble (complejo anticuerpo/vehículo) como se describe anteriormente, y puede usarse en el procedimiento de análisis inmunológico de la presente invención.

Como el anticuerpo TIH es un factor de inicio de la TIH (trombocitopenia inducida por heparina), la cantidad de anticuerpo TIH contenida en una muestra puede medirse usando el procedimiento de la presente invención para medir de forma cuantitativa un anticuerpo TIH, y puede detectarse la presencia o ausencia de TIH y/o el grado de TIH.

Para llevar a cabo de forma conveniente la presente invención, puede usarse preferentemente un *kit* de reactivos que contenga el patrón de anticuerpo TIH y el complejo heparina/FP4. El patrón de anticuerpo TIH pueden ajustarse previamente a una concentración óptima, o pueden prepararse apropiadamente cuando se usen. Puede añadirse al *kit* un vehículo insoluble sobre el que se va a inmovilizar el complejo heparina/FP4, o un vehículo insoluble sobre el que se ha inmovilizado previamente el complejo heparina/FP4. Pueden añadirse al *kit* un anticuerpo marcado antiinmunoglobulina humana para la detección, o un fragmento de anticuerpo antiinmunoglobulina humana marcado. Las preparaciones y el uso del *kit* pueden llevarse a cabo según un manual adjuntado al *kit*.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora más mediante, pero en modo alguno limitada a, los ejemplos siguientes.

«Ejemplo 1»

Preparación del complejo heparina/FP4

- 5 El factor plaquetario 4 recombinante se preparó según el siguiente procedimiento.

Se sintetizó químicamente un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 32-101 del factor plaquetario 4 humano [nº de acceso P02776 del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional de Información Biotecnológica)] mediante un procedimiento de PCR. Para llevar a cabo una expresión directa en un sistema de expresión de *E. coli*, se construyó un vector de expresión GST-FP4 para expresar FP4 que tenía GST (glutación S-transferasa) y una secuencia de corte PSP (PreScission Protease) en el N-terminal. Se transformó una *E. coli* BL21 (DE3) anfitriona con este vector de expresión, y se estudiaron las condiciones del cultivo.

- 15 El rendimiento de GST-FP4 purificado mediante una cromatografía de afinidad con una glutatión sefarosa 4B fue aproximadamente de 20 mg por l de cultivo (correspondiente aproximadamente a 5 mg de FP4; medido mediante SDS-PAGE). El producto purificado se escindió con PSP durante toda la noche, y la eficiencia de escisión de GST-FP4 fue aproximadamente del 100 %. Para mejorar la pureza de la purificación, la muestra escindida se purificó utilizando RESOURCE S (eluido con NaCl), y se purificó más usando HiTrap Heparin HP (eluida con NaCl). Como resultado, se obtuvieron 1,1 ml de FP4 de 6,4 mg/ml (calculados a partir de una absorbancia a 280 nm (Abs280)) de *E. coli* correspondiente a 3 l de cultivo.

- 20 El FP4 se desnaturalizó y se redujo en presencia de 6 mol/l de clorhidrato de guanidina y 50 mmol/l de DTT (ditiotreitól), y se sustituyó con una solución desnaturalizante compuesta por 8 mol/l de urea y 5 mmol/l de DTT. Este FP4 desnaturalizado se concentró a 10 mg/ml, y se diluyó 100 veces con un tampón renaturalizante que contenía 1 mmol/l de glutatión oxidado y 10 mmol/l de glutatión reducido a temperatura ambiente para llevar a cabo la renaturalización. Esta solución renaturalizante se aplicó a una columna de heparina, y el FP4 se eluyó usando un gradiente lineal de concentración de 0,3 a 2 mol/l de NaCl en un tampón fosfato sódico 10 mmol/l (pH 7,5), y se fraccionó una fracción de heparina de alta afinidad eluida a 1,6 mol/l de NaCl. Esta fracción se usó como FP4 recombinante en los experimentos posteriores.

- 25 Según el procedimiento desvelado en Heparin-induced Thrombocytopenia (Marcel Dekker, Inc. New York, T.E.Warkentin y cols.), se mezclaron 470 µg/ml de FP4 recombinante preparado como se ha descrito anteriormente con 14 unidades/ml de heparina, sal sódica (de mucosa intestinal porcina, CALBIOCHEM) en un tampón a pH 7,5 a temperatura ambiente durante 2 horas para preparar un complejo heparina/FP4.

«Ejemplo 2»

Preparación de un anticuerpo antiheparina/FP4 de ratón

- 35 Se inmunizó una hembra de ratón BALB/C de 7 semanas de edad con el complejo heparina/Fp4 preparado en el ejemplo 1 para preparar anticuerpos antiheparina/FP4 de ratón. Más particularmente, el complejo heparina/Fp4 se diluyó cuatro veces, y se mezcló con una cantidad equivalente de un adyuvante completo de Freund. Se inmunizó a la ratona por vía subcutánea e intraperitoneal con 500 µl de la mezcla. Esta inmunización se llevó a cabo de la misma manera tres veces cada 2 semanas, y se prepararon hibridomas a partir de células del bazo según un procedimiento convencional. Los hibridomas resultantes se cribaron mediante el procedimiento de ELISA descrito en el ejemplo 5 para seleccionar 5 clones (10E6, 6G5-6H4, 5A1, 1G2B, y 2D6B) los cuales reaccionaron con el complejo heparina/FP4. La tipificación de cada anticuerpo monoclonal se determinó según un procedimiento convencional para confirmar que todos los anticuerpos monoclonales eran IgGk. Cada hibridoma se administró a la cavidad abdominal de un ratón. Después de 2 semanas, se recogieron las ascitis y se aplicaron a una columna de proteína G para purificar IgG, y se obtuvieron los anticuerpos monoclonales antiheparina/FP4 de ratón.

- 45 La reactividad de estos 5 clones frente a FP4 solo se estudió mediante el procedimiento de ELISA descrito en el ejemplo 5, para confirmar que todos los anticuerpos monoclonales reaccionaban fuertemente con FP4.

«Ejemplo 3»

Preparación de patrón de anticuerpo TIH (ligamiento de IgG humana al anticuerpo antiheparina/FP4 de ratón)

- 50 A 0,5 mg de IgG humana purificada (1 ml de tampón fosfato de 50 mmol/l, pH 7,0 que contenía 0,25 mol/l de NaCl), que estaba disponible en el mercado, se añadieron 21,3 µg de LC-SPDP (hexanoato de succinimidil 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido) hexanoato, Pierce, 10 µl de dioxano) y se reaccionaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. A continuación, se añadieron 0,28 ml de ditiotreitól de 140 mmol/l (en agua destilada) y se dejó reposar a temperatura ambiente para llevar a cabo la reducción. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de Sefadex G-25 (1,5 cm x 12 cm) equilibrada con un tampón fosfato de 50 mmol/l, pH 7,0 que contenía 1 mmol/l de

EDTA, y el pico de la proteína que se eluyó en primer lugar se recogió controlando la absorbancia a 280 nm.

A 0,5 mg del anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 preparado como anteriormente (clon 5A1, 1 ml de tampón fosfato de 50 mmol/l, pH 7,0 que contenía 0,25 mol/l de NaCl), se añadieron 52 µg de SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, Pierce, 30 ml de dimetilformamida) y reaccionaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de Sefadex G-25 (1,5 cm x 12 cm) equilibrada con un tampón fosfato de 50 mmol/l, pH 7,0 que contenía 1 mmol/l de EDTA, y el pico de la proteína que se eluyó en primer lugar se recogió controlando la absorbancia a 280 nm.

La IgG humana en la que se habían introducido los grupos SH como anteriormente, se mezcló con una cantidad equivalente del anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 en el que se introdujeron grupos maleimida, y esta mezcla se dejó reposar toda la noche a 4 °C. Como bloqueante para el exceso de grupos maleimida, se añadieron 10 µl de 2-mercaptoetilamina de 3 mg/ml (en agua destilada) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas para llevar a cabo una reacción. El producto de reacción se fraccionó mediante una columna de Sefacril S-200 (2,5 x 40 cm) equilibrada con una solución salina fisiológica, y se recogió el pico de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana, que se eluyó antes de la IgG humana.

El patrón de fraccionamiento del HPLC por filtración en gel del anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana se muestra en la figura 1. El pico a un tiempo de elución de alrededor de 30 a 40 minutos se recogió como el anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana. Se considera que se unieron una o más IgG humanas al anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4.

El pico a un tiempo de elución de alrededor de 50 minutos fue un exceso no relacionado de IgG humana, y el pico a un tiempo de elución de alrededor de 80 minutos fueron compuestos de bajo peso molecular tales como un exceso no relacionado de agente reticulante (bloqueante).

«Ejemplo 4»

Preparación de patrón de anticuerpo TIH (ligamiento de la fracción IgG-Fc humana al anticuerpo antiheparina/FP4 de ratón)

Se ligó un mg de una fracción IgG-Fc humana (fabricada por BETHYL, nº de catálogo P80-204, adquirido de Cosmo Bio) a 0,5 mg de cada anticuerpo antiheparina/FP4 de ratón (5A1, 2D6B, y 10E6) mediante la repetición de los procedimientos descritos en el ejemplo 3, excepto porque se usó la fracción IgG-Fc humana en lugar de la IgG humana, y porque se usaron múltiples clones de anticuerpo.

El patrón de fraccionamiento del HPLC por filtración en gel de un anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana se muestra en la figura 2. El primer pico a un tiempo de elución de alrededor de 30 a 40 minutos se recogió como el anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana. Se considera que se unieron una o más fracciones IgG-Fc humanas al anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4.

El pico a un tiempo de elución de alrededor de 60 minutos fue un exceso no relacionado de fracción IgG-Fc humana, y el pico a un tiempo de elución de alrededor de 80 minutos fueron compuestos de bajo peso molecular tales como un exceso no relacionado de agente reticulante (bloqueante).

«Ejemplo 5»

Confirmación de la reactividad del patrón de anticuerpo TIH

La reactividad del anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana y de los anticuerpos monoclonales de ratón antiheparina/FP4 ligados a la fracción IgG-Fc humana que se prepararon en los ejemplos 3 y 4, respectivamente se confirmaron de la forma siguiente.

En cada pocillo de una placa de ELISA para adsorción física (placa Coaster para EIS/RIA, de alta unión 2592: fabricada por Coaster), se dispensaron 100 µl de PBS de 10 mmol/l, pH 7,3, que contenía 1,2 µg del factor plaquetario 4 recombinante (FP4) preparado en el ejemplo 1, y 0,04 unidades de heparina (de heparina, sal sódica, de mucosa intestinal porcina, fabricada por CALBIO-CHEM), y se dejó reposar toda la noche a 4 °C para recubrir los pocillos de reacción. Además, se dispensaron 100 µl del tampón que no contenía heparina pero contenía FP4 en algunos otros pocillos, y se dejó reposar toda la noche a 4 °C para recubrir los pocillos de reacción.

A continuación, los pocillos de reacción se lavaron tres veces con un líquido de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,1 %), y cada uno de los anticuerpos, monoclonal de ratón anticomplejo heparina/FP4 ligado a IgG humana y monoclonal de ratón anticomplejo heparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana, que se diluyeron de forma secuencial con un diluyente (PBS) que contenía suero normal de cabra al 20 %, se dispensaron en los pocillos, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para llevar a cabo una reacción.

Después de que los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, se dispensaron en los pocillos 100 µl de un anticuerpo antiinmunoglobulina humana marcado con peroxidasa de rábano picante (fracción F(ab')₂ de

anticuerpo antiinmunoglobulina humana de cabra marcado con peroxidasa y purificado por afinidad; fabricado por Jackson ImmunoResearch) diluido 3000 veces con el diluyente, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para llevar a cabo una reacción. A continuación, los pocillos se lavaron cuatro veces con el líquido de lavado, y se dispensaron en los pocillos 100 µl de un líquido de revelado (tampón acetato de 50 mmol/l, pH 5,5, que contenía peróxido de hidrógeno al 0,006 % y 2 mg de o-fenilendiamina), y reaccionaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se añadieron 100 µl de un líquido de frenado (ácido sulfúrico de 0,5 mol/l), y el grado de revelado se midió usando un lector de placas de ELISA (lector de microplacas MPR-A4i; Toso Co., Ltd.) equipado con un filtro que tenía una longitud de onda principal de 492 nm y una sublongitud de onda de 620 nm.

La reactividad del anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana contra la placa recubierta con el complejo heparina/FP4 (placa de complejo heparina/FP4) o la placa recubierta con FP4 (placa de FP4) se muestra en la figura 3. La reactividad de cada uno de los anticuerpos monoclonales de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG-Fc humana contra la placa de complejo heparina/FP4 o la placa de FP4 se muestra en la figura 4 (5A1), la figura 5 (2D6B), y la figura 6 (10E6).

Como controles negativos, se examinó de una forma similar la reactividad de cada uno de los anticuerpos monoclonales de ratón antiheparina/FP4 contra la placa de complejo heparina/FP4 o la placa de FP4. Como los anticuerpos monoclonales de ratón antiheparina/FP4 no tienen un componente de IgG humana, se usó un anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón marcado con HRP (anticuerpo IgG de conejo antirratón marcado con peroxidasa de rábano picante *-horseradish peroxidase-*; fabricado por DAKO) como el anticuerpo de marcaje. Los resultados se muestran en la figura 7 (5A1), la figura 8 (2D6B), y la figura 9 (10E6).

Con respecto a todos los anticuerpos monoclonales de ratón antiheparina/FP4, el ligamiento al componente de IgG humana pudo proporcionar anticuerpos modificados que apenas reaccionaban con FP4 solo, pero reaccionaban fuertemente con el complejo heparina/FP4, igual que un autoanticuerpo humano (anticuerpo TIH).

Por tanto, se confirmó que estos anticuerpos modificados (los anticuerpos anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a IgG humana y anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana) podían usarse como un patrón de anticuerpo TIH para medir el anticuerpo TIH contenido en muestras humanas.

«Ejemplo 6»

Medición y cuantificación de anticuerpo TIH contenido en muestras humanas

Para cuantificar el anticuerpo TIH contenido en muestras humanas, se preparó una curva patrón usando el patrón de anticuerpo TIH anteriormente preparado (anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 ligado a la fracción IgG-Fc humana (5A1)). Este patrón de anticuerpo TIH corresponde a 2 unidades por 1 µg/ml. El patrón de anticuerpo TIH se diluyó en 0, 0,3, 0,6, y 1 µg/ml (correspondientes a 0, 0,6, 1,2, y 2 unidades, respectivamente), la reactividad contra el complejo heparina/FP4 se midió de una manera similar a la descrita en el ejemplo 5. Los valores de DO fueron 0,005, 1,140, 1,743, y 2,191, respectivamente. A partir de estos valores, se preparó una curva patrón usando una aproximación segmentaria. El resultado se muestra en la figura 10. Se encontró que podía construirse una curva patrón que pasaba por los cuatro puntos obtenidos

Se diluyeron muestras reales (80 muestras) 101 veces, y la reactividad contra la placa de complejo heparina/FP4 se midió de una manera similar a la descrita en el ejemplo 5. Los valores de DO obtenidos y la curva patrón preparada anteriormente se usaron para calcular cada concentración (µg/ml). El resultado se muestra en la tabla 1. Con respecto a todas las muestras, la concentración del anticuerpo TIH contenido en cada muestra pudo determinarse a partir de la curva patrón.

Tabla 1

Muestra nº	Dia-1	Dia-2	Dia-3	Dia-4	Dia-5	Dia-6	Dia-7	Dia-8	Dia-9	Dia-10
Valor de DO	0,138	0,211	0,173	0,167	0,301	0,275	0,203	0,233	0,225	0,143
Conc.	0,032	0,049	0,040	0,039	0,071	0,065	0,047	0,054	0,053	0,033
Muestra nº	Dia-11	Dia-12	Dia-13	Dia-14	Dia-15	Dia-16	Dia-17	Dia-18	Dia-19	Dia-20
Valor de DO	0,144	0,146	0,184	0,192	0,177	0,142	0,151	0,172	0,218	0,156
Conc.	0,033	0,034	0,043	0,045	0,041	0,033	0,035	0,040	0,051	0,036

ES 2 561 984 T3

(continuación)

Muestra nº	Dia-21	Dia-22	Dia-23	Dia-24	Dia-25	Dia-26	Dia-27	Dia-28	Dia-29	Dia-30
Valor de DO	0,185	0,244	0,207	0,292	0,210	0,221	0,198	0,564	0,109	0,183
Conc.	0,043	0,057	0,048	0,069	0,049	0,052	0,046	0,136	0,025	0,042
Muestra nº	Dia-31	Dia-32	Dia-33	Dia-34	Dia-35	Dia-36	Dia-37	Dia-38	Dia-39	Dia-40
Valor de DO	0,185	0,169	0,246	0,230	0,107	0,110	0,163	0,879	0,631	0,771
Conc.	0,043	0,039	0,058	0,054	0,024	0,025	0,038	0,220	0,153	0,190
Muestra nº	Dia-41	Dia-42	Dia-43	Dia-44	Dia-45	Dia-46	Dia-47	Dia-48	Dia-49	Dia-50
Valor de DO	0,163	0,158	0,127	0,172	0,169	0,075	0,135	0,163	0,145	0,210
Conc.	0,038	0,036	10,029	0,040	0,039	0,017	0,031	0,038	0,033	0,049
Muestra nº	Dia-51	Dia-52	Dia-53	Dia-54	Dia-55	Dia-56	Dia-57	Dia-58	Dia-59	Dia-60
Valor de DO	0,190	0,224	0,130	0,126	0,133	0,102	0,104	0,134	0,129	0,154
Conc.	0,044	0,052	0,030	0,029	0,030	0,023	0,024	0,031	0,030	0,036
Muestra nº	Dia-61	Dia-62	Dia-63	Dia-64	Dia-65	Dia-66	Dia-67	Dia-68	Dia-69	Dia-70
Valor de DO	0,167	0,292	0,29	0,901	0,313	0,357	0,507	0,187	0,191	0,387
Conc.	0,039	0,069	0,070	0,226	0,074	0,084	0,121	0,043	10,044	0,092
Muestra nº	Dia-71	Dia-72	Dia-73	Dia-74	Dia-75	Dia-76	Dia-77	Dia-78	Dia-79	Dia-80
Valor de DO	0,446	2,734	2,435	0,091	0,125	0,341	0,485	0,119	0,150	0,158
Conc.	0,106	1,551	1,248	0,020	0,029	0,081	0,116	0,027	0,035	0,036

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de preparación de un patrón de anticuerpo TIH, **caracterizado por** el ligamiento de una IgG humana o un fragmento Fc de la misma, mediante un agente reticulante para modificar proteínas, a un anticuerpo monoclonal obtenido mediante inmunización de un animal no humano con un complejo heparina/FP4, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona con el complejo heparina/FP4, y reacciona con FP4 solo, y en el que el patrón de anticuerpo TIH reacciona con el complejo heparina/FP4, pero no reacciona con FP4.
2. Un procedimiento de medición cuantitativa de un anticuerpo TIH contenido en una muestra, **caracterizado por** la preparación de un patrón de anticuerpo TIH de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1 y el uso de dicho patrón de anticuerpo TIH en dicho procedimiento.

10

Figura 1

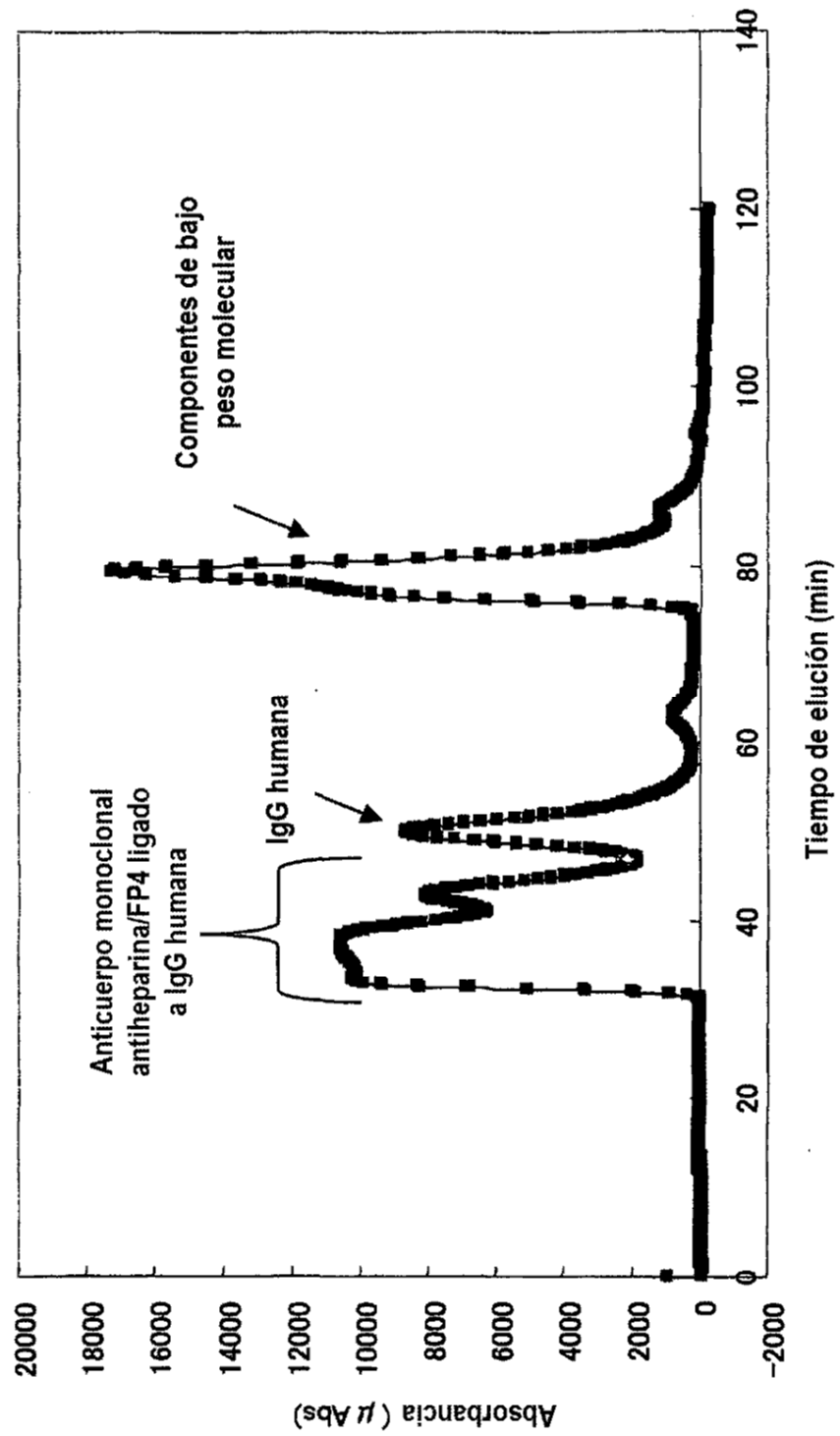


Figura 2

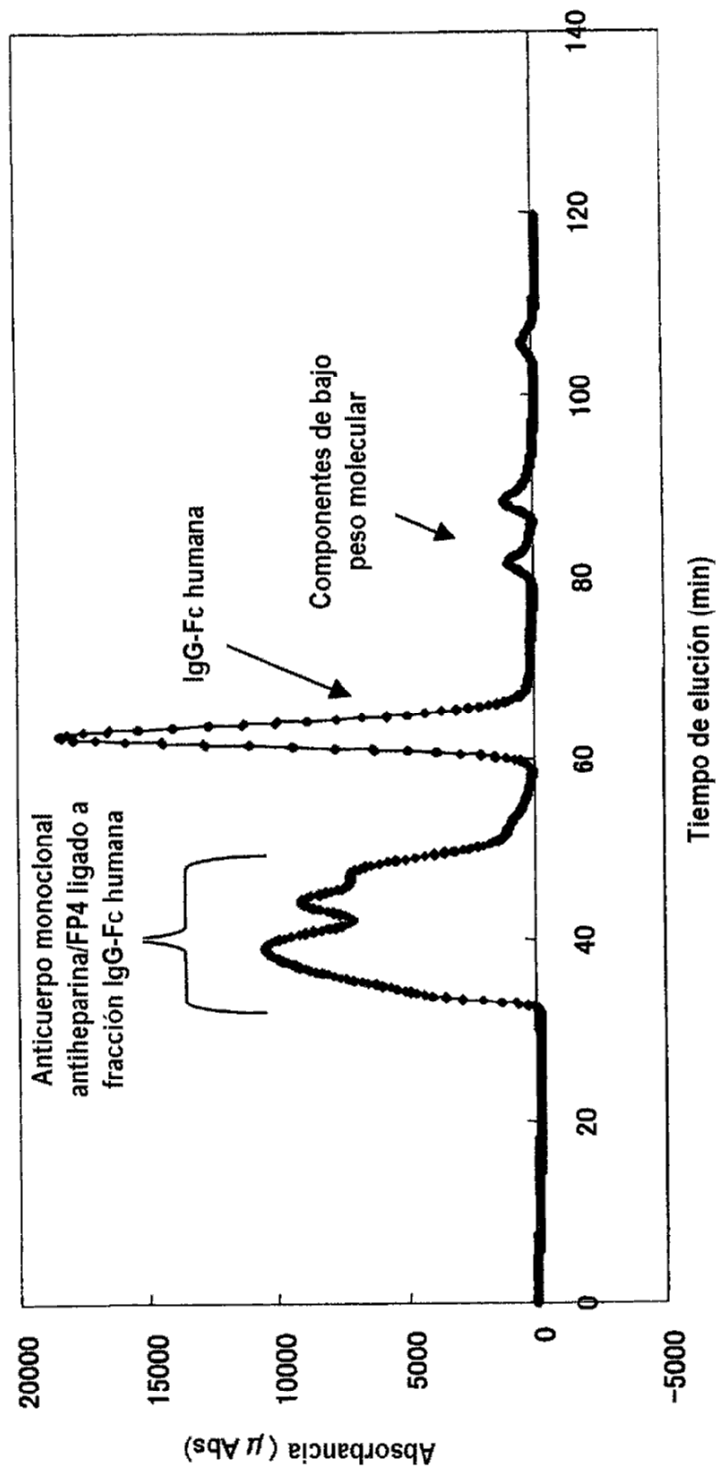


Figura 3

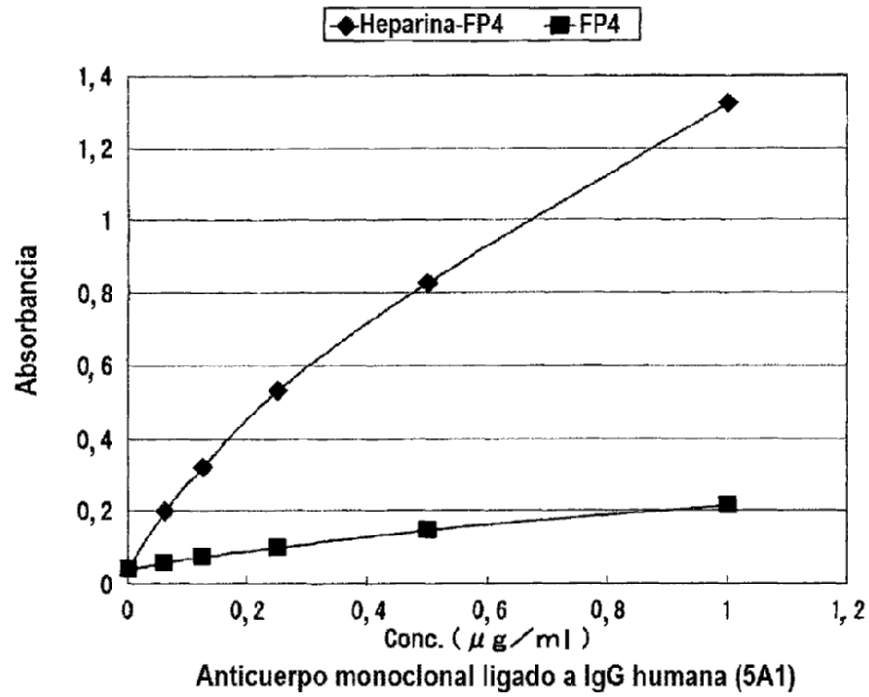


Figura 4

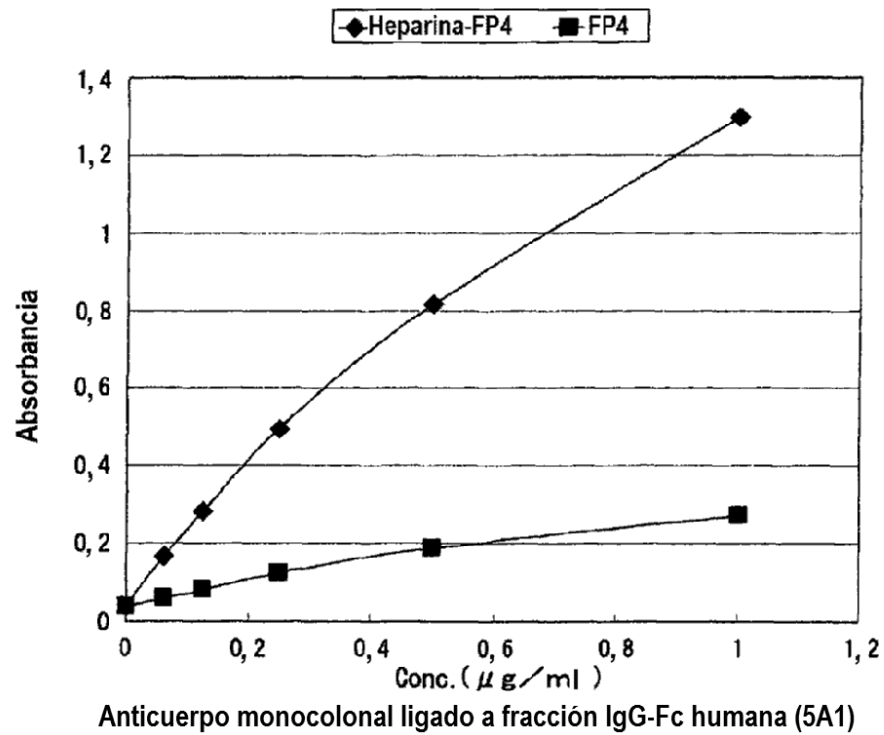


Figura 5

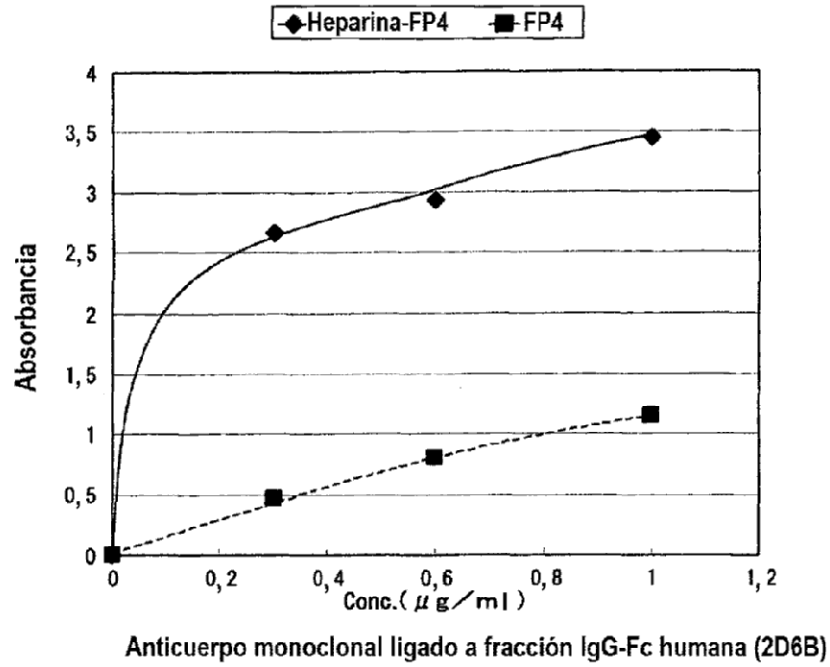


Figura 6

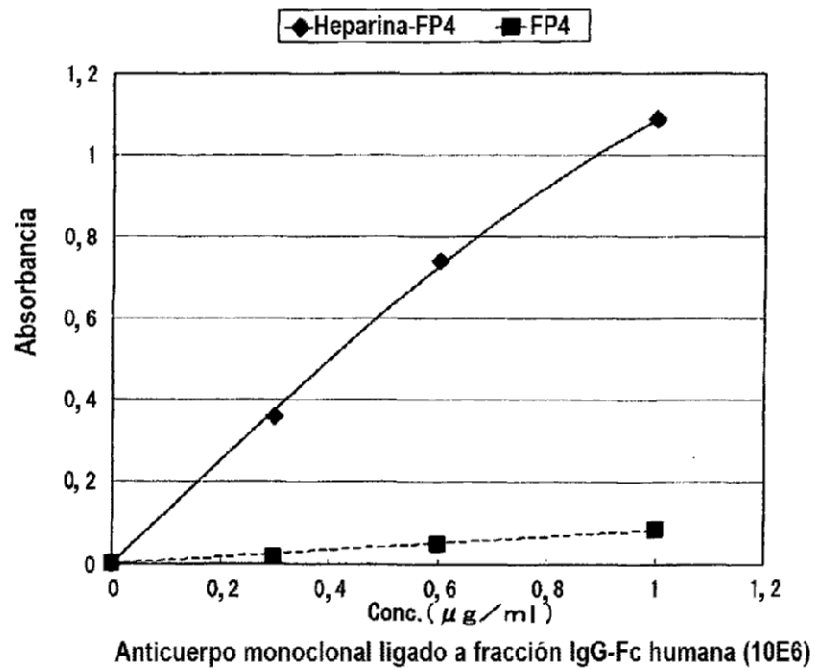
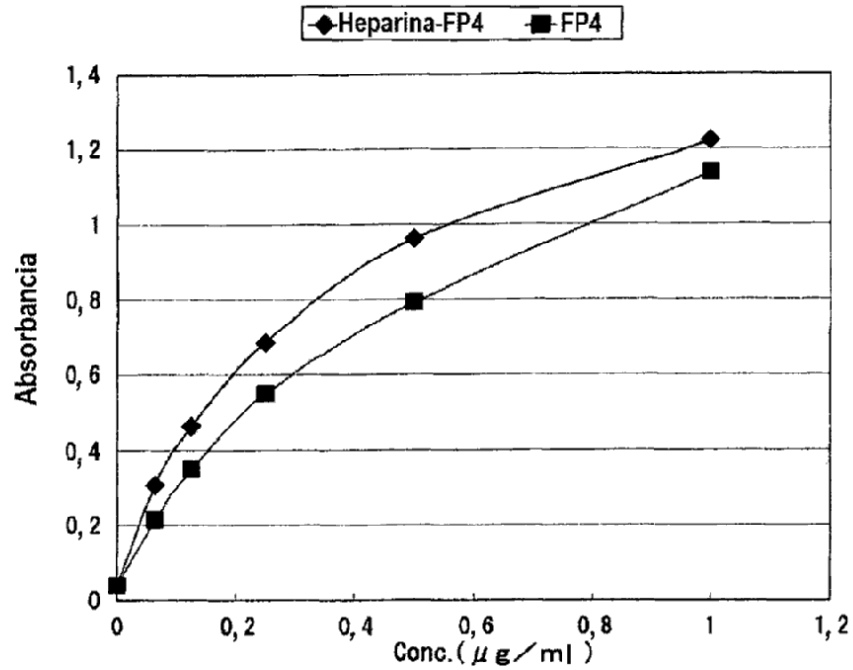
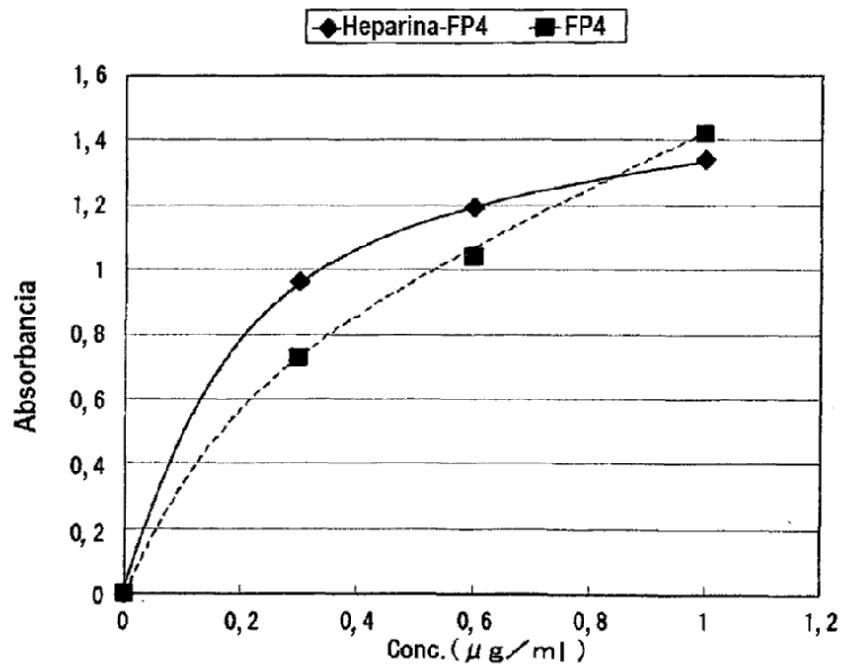


Figura 7



Anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 (5A1)

Figura 8



Anticuerpo monoclonal de ratón antiheparina/FP4 (2D6B)

Figura 9

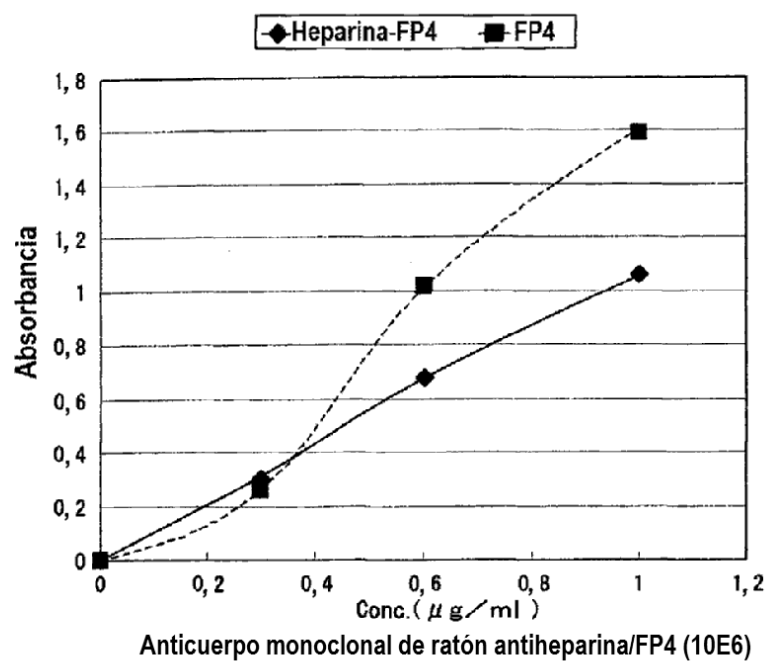


Figura 10

