

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 791**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2008 PCT/US2008/072083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09023457**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2008 E 08782610 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2188306**

54 Título: **Fragmentos de clivaje inmunoglobulina utilizados como indicadores de enfermedades y aglutinante de fijación**

30 Prioridad:

10.08.2007 US 955162 P

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

13.12.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**JORDAN, ROBERT;
PETRONE, DIANE, D. y
RYAN, MARY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 593 791 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

5 Fragmentos de clivaje inmunoglobulina utilizados como indicadores de enfermedades y aglutinante de fijación

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La invención se refiere a indicadores de diagnóstico y pronóstico y métodos y reactivos para su detección. La invención se refiere además a métodos para el control de la historia natural de la enfermedad en un paciente.

Descripción de la técnica relacionada

15 En medicina, un biomarcador es una sustancia bioquímica que puede ser utilizado para medir el progreso de la enfermedad o los efectos del tratamiento, es decir, un indicador de diagnóstico o pronóstico. Un biomarcador que refleja efectivamente la historia natural de la enfermedad y la enfermedad de control es la hemoglobina A1c para el control glucémico en pacientes diabéticos. Debido a la larga vida media de HbA1c en el suero, que sirve como un registro reciente de la excursión de glucosa en la sangre desde los niveles ideales, así como la duración de tales excursiones. Un biomarcador utilizado actualmente de condiciones inflamatorias sistémicas es la proteína C reactiva (PCR) (Pepys MB et al. J. Clin Invest 111; 1805-1812, 2003). La PCR es un reactante de fase aguda que se produce en respuesta a una amplia variedad de condiciones inflamatorias agudas. PCR se sintetiza en el hígado en respuesta a las señales de citoquinas, incluyendo TNF e IL-6 que a su vez migran desde el sitio distante de la inflamación. Un aumento en suero de PCR se produce en infección, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular, infarto de miocardio y otros trastornos inflamatorios agudos.

20 Inmunoglobulinas circulantes, y específicamente las de los anticuerpos de la clase IgG, son las principales proteínas del suero. Es bien conocido que las proteasas humanas están asociadas con enfermedades inflamatorias, proliferativas, metastásicas, e infecciosas. Proteasas humanas tales como metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y la elastasa de neutrófilos escinden el polipéptido de cadena pesada de IgG en un residuo único a cada proteasa como también lo hacen proteasas bacterianas tales como endopeptidasa glutamilo (*Staph. aureus*) o enzima degradante de inmunoglobulina de streptococcus (*Strep. pyogenes*). Los sitios de escisión de la cadena pesada se agrupan alrededor de la región denominada el dominio bisagra, donde se produce el enlace de disulfuro entre cadenas de las dos cadenas pesadas. La región debajo de la bisagra constituye la región Fc y comprende los sitios responsables de las funciones efectoras de unión a IgG. En el caso de microorganismos, la expresión de la proteasa es una potencial vía de virulencia adyuvante permitiendo que organismos eviten la opsonización (Rooijackers et al. Microbes and Infection 7: 476-484, 2005) en la medida en que la liberación proteolítica del dominio Fc por escisión debajo de la bisagra neutraliza eficazmente las funciones que de otro modo conducirían a la focalización y la muerte de esa célula patológica. Por lo tanto, la elaboración de proteasas específicas puede ser representativa de una gran variedad de estados de enfermedad como el cáncer, la inflamación y las enfermedades infecciosas.

25 Que la degradación de IgG es mayor en ambientes *in vivo* patológicas como lo demuestra la presencia de autoanticuerpos naturales IgG que se unen al dominio de bisagra escindido (Knight et al, 1995; Nasu et al., 1980; Persselin y Stevens, 1985, Temess, et al. 1995 J Immunol 154: 6446-6452). Estos autoanticuerpos unen también los fragmentos Fab y F(ab)₂ generados por varias proteinasas (incluyendo la papaína y pepsina), con reactividad particularmente fuerte para el dominio de bisagra inferior que restan como residuos C-terminales en moléculas F(ab)₂ (Terness et al., 1995). La detección de los productos de escisión reales ha sido reportada (Fick et al, 1985;. Goldberg y Whitehouse, 1970; Wailer, 1974), pero un ensayo robusto que permitiría que estos fragmentos sirvieran como biomarcadores no se ha desarrollado, posiblemente debido a las bajas concentraciones en suero resultantes de la rápida eliminación de los diversos fragmentos o a problemas técnicos en la detección de los fragmentos en medio de la gran cantidad de inmunoglobulina en sangre y tejidos. Un anticuerpo específico se preparó (Eckle, et al. 1988. Adv. Exp. Med. Biol. 240: 531-534) para la detección de dominio Fc de elastasa de neutrófilo humano escindido que detecta Fc a una concentración media de 0,62 ug/ml directamente en fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide pero no en fluido synoviai de pacientes con otros tipos de enfermedad de las articulaciones.

30 Welschof et al. (1997) PNAS 94:1902-1907 describe un dominio de unión a antígeno de un autoanticuerpo humano IgG-anti(Fab)₂.

35 Gearing et al. (2002) Immunology Letters 81(1):41-48 describe la escisión selectiva de IgG humana por metaloproteinasas de matriz.

40 Schmidt et al. (2007) Biopolymers 88(4):556 describe un enfoque péptido sintético para la aclaración de los puntos de la reactividad de anticuerpos auto natural para fragmentos proteolíticos de IgG humana.

45 Ryan et al. (2008) Molecular Immunology 45:1837-1846 describe la proteólisis de las IgG purificadas por las enzimas

humanas y bacterianas *in vitro*.

Por lo tanto, la capacidad de evaluar el tipo y la cantidad de IgG producto(s) de escisión en los fluidos corporales o la sangre de los sujetos podría ser utilizada como un biomarcador de actividad de la enfermedad específica. reactivos
5 específicos y métodos para tales determinaciones proporcionarían herramientas útiles para los ensayos médicos de diagnóstico y pronóstico.

Resumen de la invención

10 La invención proporciona una composición de anticuerpo que comprende al menos un anticuerpo que se une específicamente a un producto de escisión de la proteasa IgG que se caracteriza por a) tener un peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacto en condiciones no desnaturalizantes y b) que es separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno de 135 kDa y un fragmento que contiene CH2 bajo
15 desnaturalización pero no condiciones reductoras y c) en el que el reactivo no reacciona con IgG intacta,

y en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un sitio de escisión específica de la proteasa en IgG humana producida por IdeS, TCPPCPAPPELLG.

20 La invención proporciona además un análogo de péptido de sitio de escisión de proteasa de IgG humana que consiste en TCPPCPAPPELLG unida covalentemente a hemocianina de lapa californiana a través de la terminal N.

La invención proporciona además un método de preparación del anticuerpo de la invención usando un animal no humano inmunizado con el análogo de péptido de la invención, en el que el reactivo se purificó a partir del suero de dicho animal por preabsorción sobre una matriz de afinidad de IgG humana.

25 La invención proporciona además un método para detectar un proceso de enfermedad en un sujeto mediante el análisis de una muestra de tejido del sujeto, en el que dicho método comprende la detección por la composición de anticuerpo de la invención de una IgG proteolíticamente escindida por IdeS caracterizada por a) tener un peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacta en condiciones fisiológicas y b) que es separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno de 135 kDa y un fragmento que contiene CH2 bajo condiciones desnaturalizantes pero no reductoras.
30

La invención proporciona además un kit que incluye un reactivo para la detección de un marcador de enfermedad en el tejido de un sujeto, cuyo reactivo comprende al menos un anticuerpo que se une específicamente a una IgG escindida, cuyo anticuerpo es capaz de detectar un producto de escisión IgG caracterizado por a) tener un peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacto bajo condiciones no desnaturalizantes y b) ser separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno de 135 kDa y un CH2 que contiene el fragmento bajo condiciones desnaturalizantes pero no reductoras y c) en el que el reactivo no reacciona con IgG intacta,
35

y en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un sitio de escisión específica de la proteasa en IgG humana producida por IdeS, TCPPCPAPPELLG.
40

45 La invención proporciona además la composición de anticuerpo de la invención para uso en terapia.

La invención se refiere a reactivos y uso de los reactivos para detectar un proceso de enfermedad asociada con la elaboración de las proteasas, siendo las proteasas manifestaciones de la patología de la enfermedad, así como agentes que limitan las defensas inmunológicas del huésped. En un aspecto de la invención, los reactivos y el uso de los reactivos en un ensayo, detecta anticuerpos anti-enfermedad, siendo los anticuerpos específicos para objetivos relacionados con la patología de la enfermedad. Los reactivos se dirigen a la evaluación de un producto de degradación de IgG que es el resultado de dicha escisión proteolítica.
50

En otra realización, los métodos de la descripción se dirigen a la detección de un producto de escisión de IgG que se caracteriza por 1) tener un peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacto en condiciones fisiológicas y 2) que es separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno y un fragmento de 32 kDa bajo condiciones desnaturalizantes, pero no condiciones reductoras y 3) no exhiben actividad ADCC en un ensayo *in vitro*. En un aspecto del método de detección del producto de escisión IgG de la invención, se proporciona un reactivo específico capaz de detectar el producto de escisión, siendo el reactivo al menos un anticuerpo capaz de unirse a dicho producto de escisión.
55

60 En otra realización de la descripción, se proporcionan las secuencias para la generación de los reactivos útiles para la detección del producto de escisión IgG que son útiles para la inmunización, paneo, y la selección del reactivo de producto anti-IgG de escisión de la descripción. En un aspecto, la secuencia se selecciona del grupo que consiste de al menos 5 aminoácidos contiguos seleccionados de las secuencias de la región bisagra IgG humana de SEQ ID NO: 1, 2, 3, o 4 que se encuentran en el lado del terminal amino de una sitio de escisión de proteasa. En una realización, las secuencias se seleccionan de entre los de SEQ ID NOs. 5-11 y truncamientos N terminales de los
65

misimos. En otro aspecto, se proporciona un método de diseño de un péptido inmunógeno basado en el sitio de escisión proteolítica de una molécula de IgG humana.

En este documento se describen métodos de preparación de un anticuerpo de producto de escisión anti-IgG de la descripción que incluye secuencias de ácidos nucleicos, vectores y células huésped para la producción recombinante de anticuerpos de producto de escisión anti-IgG. En otro aspecto del método de la fabricación de los anticuerpos de producto de escisión anti-IgG, animales de huésped inmunes se dan a conocer cuyo suero de animal es una fuente de los anticuerpos de la divulgación de la cual el reactivo se prepara por métodos descritos o conocidos en la técnica.

En otra realización de la invención, se proporciona un kit para la detección de producto de escisión anti-IgG que comprende anticuerpos de producto de escisión anti-IgG de la invención.

En este documento también se describe un método de administración de un anticuerpo específico contra la escisión de IgG para el tratamiento de un paciente con el fin de restaurar las funciones efectoras de un producto de escisión de IgG.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

FIG. 1 representa los diferentes dominios de un anticuerpo de mamífero típico de clase IgG que muestran su relación con la bisagra y los productos de escisión con pepsina y papaína definidos como Fab, F(ab')₂, y Fc.

FIG. 2 muestra cuatro análisis individuales de electroforesis microcapilar Agilent Biosizing como imágenes de gel, a veces durante cada uno de los resúmenes de proteinasa de un anticuerpo IgG1k humana, Mab1, por 1% en peso de MMP-3 (A) humana, IdeS estreptocócica (B), endopeptidasa I de glutamilo estafilocócico (C) y elastasa de neutrófilo humana (D) a 37°C. Normas sobre cada gel (carril 1) corresponden a un quimérico IgG1 humano/murino intacto y fragmentos de escisión conocidos.

FIG. 3 muestra la secuencia de cadena pesada de IgG1 humana alrededor de la región bisagra; las posiciones de los principales escisiones proteolíticas se indican mediante flechas.

FIG. 4 es una transferencia Western que muestra el curso temporal de degradación IgG biotinilada murina/humana por exudado de herida.

FIG. 5 un gráfico que muestra la especificidad relativa de los antisueros generados en conejos inmunizados con producto de degradación conjugado F(ab')₂ a partir de tres proteasas diferentes: MMP-3, V8, y IdeS TCPPCPAP, residuos 7-14 de SEQ ID NO: 1 que corresponden al sitio de escisión MMP-3, TCPPCPAPE, residuos 7-15 de SEQ ID NO: 1 correspondiente al sitio de endopeptidasa de glutamilo, y TCPPCPAPELLG, residuos 7-18 de SEQ ID NO: 1 que corresponde al sitio IdeS. La reactividad ELISA de tres preparaciones individuales de anticuerpos policlonales anti bisagra de péptido de conejo con fragmentos F(ab')₂ de Mab3 IgG1k. Los fragmentos F(ab')₂ se generaron con recombinante MMP-3, endopeptidasa de glutamilo estafilocócica humana I y recombinante IdeS de *Strep. pyogenes*. Un grupo mixto de las preparaciones de anticuerpos de conejo demostró reactividad casi equivalente con cada uno de los fragmentos Mab3 F(ab')₂. Barras corresponden a la desviación estándar media ± de tres pocillos replicados.

FIG. 6 La reactividad de Western blot de las preparaciones de anticuerpos policlonales de conejo con anticuerpos digiere. IgG1 humana Mab3 intacta o que había sido parcialmente digerida con MMP-3, endopeptidasa de glutamilo (V8) o IdeS se separaron mediante SDS-PAGE seguida de inmunotransferencia. (A) Inmunotransferencia con IgG anti-humana (H+L) [carriles 1-4] o Anti...LLG policlonal de conejo [carriles 6-10]. (B) Inmunotransferencia con Anti...PAP [carriles 2-5] o Anti...APE [carriles 7-10]. Las transferencias se cortaron antes de la incubación con los anticuerpos a través de carril 5 en el panel A y el carril 6 en el panel B para permitir la detección con los antisueros individuales.

FIG. 7 es una transferencia western desarrollada utilizando el reactivo RAH-1 en muestras de un análisis de la degradación de IgG en el fluido sinovial de 5 pacientes con AR y en comparación con muestras de digestiones proteolíticas in vitro de una IgG1 monoclonal con MMP-3, glutamilo de endopeptidasa (V8) y IdeS.

FIG. 8 muestra la concentración en suero en el tiempo de varios fragmentos de escisión proteolítica, IgG intacta, sclgG y F(ab')₂; después de la inyección de los fragmentos purificados especificados en ratones, medidos usando la IgG de cabra anti humana (H+L).

FIG. 9 es un gráfico de puntos de los valores individuales de sclgG detectados por el reactivo RAH-1 en muestras de suero humano de pacientes con diagnóstico de las enfermedades como se indica en comparación al grupo de muestras de suero humano normal donde las líneas indican los valores medios en cada grupo.

FIG. 10 muestra la concentración de sclgG en suero diluido de 10 individuos con artritis reumatoide (RA) y un número igual de controles sanos, normales detectados con reactivo RAH-1 utilizando una versión mejorada de ELISA; "(2)" en el grupo de AR significa que se obtuvo el mismo valor en dos individuos separados.

FIG. 11 muestra la reactividad relativa de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido a fragmentos de escisión de bisagra IgG1 humana como análogos peptídicos y a fragmentos de anticuerpo que terminan en el residuo especificado (véase la Fig. 3).

FIG. 12 muestra la dependencia de concentración de tres anticuerpos monoclonales de conejo diferentes dirigidos a fragmentos de escisión de IgG1 humana de bisagra en la restauración de lisis celular dependiente de complemento (CDC) a $F(ab')_2$ creado por digestión con IgG1 con IdeS en comparación con un policlonal de conejo preparado a análogos de péptidos de escisión (rb poli).

Breve descripción de la lista de secuencias

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	Región de bisagra de IgG1 humana
2	Región de bisagra de IgG4 humana
3	Región de bisagra de IgG2 humana
4	Región de bisagra de IgG3 humana
5	Péptido de escisión MMP-3 y MMP12
6	Endopeptidasa de glutamilo 1 y Péptido de escisión de catepsina G
7	Péptido de escisión de IdeS
8	Péptido de escisión de plasmina
9	Péptido de escisión HNE
10	Pepsina y péptido de escisión MMP-7
11	Péptido de escisión de papaina

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

Abs = anticuerpos, ADCC = citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; CDC = citotoxicidad dirigida por complementos; HNE = elastasa de neutrófilo humano; IdeS = enzima degradante de inmunoglobulina de *S. pyrogenes*; Ig = inmunoglobulina; Mab = anticuerpo monoclonal; MMP = metaloproteasas de matriz; scIgG = IgG de escisión única; SA = estreptavidina; V8 = glutamilo endopeptidasa I de *Staph. aureus*.

Definiciones

Los fragmentos de anticuerpos; Fab, $F(ab')_2$, y Fc son términos que describen productos de escisión de anticuerpos IgG proteolíticos que pueden disociarse aún más por la reducción de los enlaces de disulfuro entre las cadenas pesadas (la región central de bisagra). Fragmentos clásicos de anticuerpos generados proteolíticamente incluyen: Fab (por ejemplo, por digestión con papaina), Fab' (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial) y $F(ab')_2$ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), factb (por ejemplo, por digestión de plasmina), pFc' (por ejemplo, por digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión de pepsina, la reducción parcial y reagregación), donde la reducción elimina la vinculación de disulfuro entre residuos de cisteína que forman enlaces entre cadenas (véase la Fig. 1). A medida que el fragmento Fc fue descrito como un fragmento de escisión de papaina que escinde IgG1 humana en residuo 224 (numeración UE), que es terminal N a la bisagra, se supone que el fragmento Fc retiene la bisagra y los enlaces de disulfuro entre las cadenas pesadas, sin embargo, debido al alto grado de asociación entre los dímeros de cadena pesada CH2-CH3 en el anticuerpo, una estructura dimérica se mantiene incluso en ausencia de los enlaces de disulfuro (bisagra). Por lo tanto, como se usa aquí "Fc" se refiere a la estructura dimérica formada por la asociación de segmentos CH2-CH3 de cadena pesada, estén o no unidos covalentemente. Se entenderá que el Fc no asociado covalentemente puede distinguirse del Fc unido a disulfuro por su capacidad de someterse a la disociación en monómeros CH2-CH3 en presencia de un desnaturalizante tal como un detergente.

Los términos "proteolítico", "de escisión proteolítica", "proteasa", y "enzima proteolítica" se utilizan indistintamente y significan un agente, por ejemplo, enzima, que es capaz de escindir una cadena de polipéptido, produciendo dos o más fragmentos, en donde la enzima actúa bajo condiciones de temperatura normales y bajo condiciones fisiológicas o condiciones fisiológicamente compatibles. Las condiciones fisiológicas incluyen cualquier temperatura, tampón, cationes, aniones, sustrato, catalizador, pH, cofactor, o similares, los cuales se encuentran naturalmente en el cuerpo de un mamífero vivo ya sea sano o enfermo. Sin embargo, la proteasa se puede derivar de una fuente no

mamífera tal como a partir de un patógeno que puede ser de cualquier tipo de forma de vida.

Con "sclgG" o "IgG de escisión única" se entiende cualesquiera moléculas G de clase de inmunoglobulina que tienen una estructura heterodimérica que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, donde una de las cadenas pesadas ha sido sometida a escisión proteolítica en una sola cadena pesada, mientras que la segunda cadena pesada se mantiene intacta.

Por "aguas arriba" en relación con una secuencia de aminoácidos escrita del residuo N-terminal al C-terminal se entiende los residuos en la secuencia hacia el N-término de un residuo dado. A la inversa, por "aguas abajo" en relación a una secuencia de aminoácidos se quiere decir los residuos en la secuencia hacia el C-término desde un residuo dado.

Funciones de anticuerpo por subestructura

En general, inmunoglobulinas, anticuerpos, consisten en regiones de cadena polipeptídica continua que comprenden aproximadamente 100 aminoácidos que muestran un dominio globular característicamente plegado y representan diferentes elementos de la estructura. Cada 100 de las regiones de aminoácidos representa un dominio globular que es alrededor de 10-11 kDa. Para inmunogamaglobulinas (IgGs), estos dominios se agrupan en segmentos; el segmento de Fab se compone de una variable de cadena ligera unida a una región constante de cadena ligera en una sola cadena unida a través de un enlace de disulfuro a la cadena pesada de primera región constante (CH1) que es contigua con la región variable de cadena pesada; Fc se compone de dos regiones contiguas constantes de cadena pesada (CH2 y CH3) unidas a través de dos o tres enlaces de disulfuro en la región de bisagra. Los estudios han demostrado que las proteasas, tales como papaína y pepsina, preferentemente escinden los anticuerpos en los sitios que están entre los segmentos. Dos segmentos Fab idénticos conectados a través de la región de bisagra para un segmento Fc, forman así una conformación en forma de Y de la estructura de 150 kDa (véase Fig. 1). Los segmentos Fab generados usando papaína tienen típicamente un peso molecular de 46 kDa, F(ab')₂ no reducidas tienen típicamente un peso molecular de 90-100 kDa, y Fc no glicosilada, no reducida tendrá un peso molecular aparente de aproximadamente 50-60 kDa. Sin embargo, como cada especie de anticuerpo, y cada subclase de anticuerpo dentro de una especie, es ligeramente diferente, la naturaleza exacta y la ubicación de los productos de escisión y la escisión son variantes.

El antígeno se une a anticuerpos a través de un sitio de unión a antígeno en los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada (Fig. 1). Otras moléculas, conocidas como moléculas efectoras o células, se unen a otros sitios en el resto de la molécula, es decir, aparte de los sitios de unión de antígeno, y esta porción de anticuerpo incluye las secuencias de inmunoglobulina más invariantes, "la parte constante" de un anticuerpo, estos sitios se encuentran en particular en la región Fc constituida por las porciones de las cadenas pesadas que se extienden más allá de los extremos de las cadenas ligeras.

Los anticuerpos tienen varias funciones efectoras mediadas por la unión de moléculas efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares (un proceso llamado citotoxicidad mediada por complemento o CDC). La activación del complemento estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, con un sitio de receptor de Fc en la región Fc de anticuerpo de unión a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluidos IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) y 1g (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares provoca una serie de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo la inmersión y la destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, el aclaramiento de complejos inmunes, la lisis de células diana recubiertas de anticuerpos por las células asesinas (llamadas citotoxicidad mediadas por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia de placenta y el control de la producción de inmunoglobulina.

Las secuencias de todo el dominio de bisagra se conservan entre los isotipos de IgG (SEQ ID NO: 1-4) y entre las especies de mamíferos en general. El IgG1 (SEQ ID NO: 1) y IgG3 (SEQ ID NO: 1) de isotipo comprenden un par Leu-Leu que es un motivo estructural para la unión a receptor(es) Fcy y para las funciones efectoras de Fc. Otros residuos aguas abajo del "centro de bisagra", que comprenden típicamente al menos cisteína separada por dos residuos no de cisteína, también se conservan.

Los solicitantes han descubierto que un producto de escisión, sclgG, de IgG1 humana está formada por proteasas humanas y bacterianas cuando la proteólisis se produce en uno de los dos polipéptidos de cadena pesada que comprenden un IgG, mientras que no perturba la composición global de la molécula heterodimérica. En segundo lugar, los solicitantes han determinado a través de análisis cinética de ataque proteolítico en constantes de cadena pesada humana de moléculas de IgG que contiene región, que sclgG probable es el producto más abundante de la proteólisis in vivo. La existencia de sclgG como intermedio proteolítico que conduce a F(ab')₂ durante la proteólisis de IgG se ha observado previamente para la enzima MMP-3 (Gearing AJH et al, Immunol. Lett. 81: 41-48, 2002). La escisión de IgG por una proteasa estreptocócica, IdeS, también se observó para producir un producto parecido a la

IgG intacta por cromatografía de exclusión por tamaño (Vincent B et al, Biochemistry 43: 15540-15549, 2004). Sin embargo, no se informó de caracterizaciones funcionales de este producto intermedio, ni eran métodos para detectar la sclgG en muestras biológicas proporcionadas.

5 Los solicitantes han demostrado además que, in vivo, sclgG, exhibe una vida media en suero compatible con la evaluación de actividad de la enfermedad durante un periodo de varios días a meses, permitiendo por tanto el uso de sclgG como un marcador de procesos de enfermedad latente o suprimidos, o podría utilizarse para comprender la reciente historia natural y la respuesta o recuperación de una enfermedad.

10 Brevemente, los solicitantes han descubierto que la cinética de la escisión proteolítica en condiciones fisiológicas conducen a una mayor proporción de IgG proteolíticamente escindida estando en la conformación sclgG que las especies que son productos de los eventos de escisión de multiplicación, como el $F(ab')_2$ (véase Fig. 1). En el proceso de probar un gran número de proteasas, se determinó que la primera escisión de una región constante de cadena pesada en una IgG intacta procede más rápidamente que la segunda, una secuencia que conduce a una
15 acumulación temporal de las especies escindidas por separado. Esta versión de escisión única de la molécula IgG es indistinguible de su matriz intacta de muchas maneras (por ejemplo, tamaño molecular, de unión a antígeno, la capacidad de ser reconocida por la proteína A/G).

20 De acuerdo con la invención, los solicitantes han generado reactivos adecuados para la detección de productos de escisión proteolítica que incluyen $F(ab')_2$ y sclgG. Los reactivos de la invención generados usando péptidos análogos de sitio de escisión de la invención, reconoce los productos de escisión de IgG1 humana pero no reconocen IgG intacta.

25 Los solicitantes han demostrado además que los anticuerpos que reconocen productos de escisión de IgG que retienen especificidad de unión de antígenos puede restaurar las funciones efectoras tales como ADCC y CDC a la IgG escindida.

Enzimas proteolíticas y Asociación de la Enfermedad

30 Los solicitantes demuestran que los productos de escisión de anticuerpos, incluyendo sclgGs, similares en tamaño a los generados con el panel de enzima in vitro, son detectables en los exudados inflamatorios tales como el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Además, sclgG se puede detectar en el suero de pacientes con un número de enfermedades en las que localizan la actividad proteolítica es una característica conocida de la patología. El sclgG en estos estados de enfermedad se encuentra en concentraciones más altas que en los voluntarios sanos
35 normales y también es mayor que en el suero de pacientes con la enfermedad inflamatoria menos severa.

La detección de sclgG era posible gracias a la generación de anticuerpos policlonales purificados por afinidad (conejo) que se unen específicamente a epítomos recién expuestos en la cadena pesada escindida en o alrededor de los disulfuros de la bisagra, pero no reaccionan con la molécula de IgG intacta, no escindida. El apoyo de
40 confirmación para la detección de sclgG en suero es su vida útil prolongada circulante similar a IgG intacta. La capacidad de detectar sclgG en los fluidos corporales o sangre de individuos enfermos es una estrategia potencialmente nueva de biomarcadores. Se entenderá que otras especies de anticuerpo, además de conejo (por ejemplo, ratón, rata, y camello) se puede utilizar y los anticuerpos monoclonales producidos, por ejemplo, por clonación de un gen que codifica el anticuerpo para una secuencia de región de unión a anticuerpo especificado
45 cuyo anticuerpo policlonal o monoclonal retiene la capacidad de unir productos de escisión de IgG1 humana, pero que no reconocen IgG intacta son abarcados como reactivos de la invención. Otros métodos de producción de anticuerpos, por ejemplo, por selección de bibliotecas de anticuerpos de dominio, son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser utilizados como una fuente de los anticuerpos de la invención.

50 Reactivos de anticuerpos

Los anticuerpos de esta invención pueden prepararse de varias maneras bien conocidas en la técnica, utilizando criterios e inmunógenos diseñados por los solicitantes para subir o seleccionar anticuerpos útiles en la práctica de la invención.

55 En un aspecto, los anticuerpos se obtienen convenientemente a partir de hibridomas preparados mediante la inmunización de un animal con los fragmentos de escisión observados o péptidos análogos de sitios de escisión derivados de los mismos. Por lo tanto, los anticuerpos se pueden obtener mediante la inmunización de animales o la selección de bibliotecas de anticuerpos con fragmentos de escisión de anticuerpos, incluyendo $F(ab')_2$ y sclgG o truncamientos N-terminales o análogos estructurales de los mismos. En una realización, los péptidos utilizados para generar los anticuerpos se seleccionan a partir de los fragmentos de péptidos 14-mer de IgG1 que se muestran en SEQ ID NO: 5-11, en el que el residuo de terminal C del polipéptido o péptido representa el residuo de aguas arriba (lado N-terminal) del sitio de corte como se muestra en la Tabla 1 de los pares de escisión de residuos. Los fragmentos comprenden el motivo de bisagra, por ejemplo, -T-C-P-P-C- de IgG1 (residuos 7-11 de la SEQ ID NO: 1),
60 será multimérica debido a la formación de enlaces de disulfuro, a menos que los residuos de cisteína (C) han sido sustituidos con, por ejemplo residuos de alanina (A).
65

En una realización específica, el anticuerpo se genera utilizando un péptido de 8-mer correspondiente a la secuencia de aminoácidos en el lado terminal de amino del sitio de escisión de MMP-3 (TCPPCPAP, residuos 7-14 de la SEQ ID NO: 1), o péptidos extendidos correspondientes al sitio de endopeptidasa de glutamilo (TCPPCPAPE, residuos 7-15 de la SEQ ID NO: 1); o en el sitio de IdeS (TCPPCPPELLG, residuos 7-18 de la SEQ ID NO: 1). Cuando se utiliza como inmunógenos, los péptidos pueden ser convenientemente unidos covalentemente a hemocianina de lapa californiana (KLH) a través del terminal N o por medio de un resto de enlazador agregado o péptido.

Los anticuerpos de este modo se pueden obtener usando cualquiera de las técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al, eds, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994 2001); Cotligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1997-2001). Un anticuerpo de la invención puede incluir o estar derivados de cualquier mamífero, tal como pero no limitado a un ser humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, o cualquier combinación de los mismos e incluye anticuerpos de anti integrina aislados humanos, de primate, de roedo, de mamífero, quiméricos, humanizados y/o injertado de CDR, así como inmunoglobulinas, productos de escisión y otras partes especificadas y las variantes del mismo.

Bibliotecas de anticuerpos de fagos mostrados también se pueden utilizar para identificar nuevos dominios de unión con la especificidad deseada para scIgG y otros fragmentos de anticuerpos.

Al elevar o seleccionar anticuerpos u otros aglutinantes útiles en la presente invención, los reactivos específicos que se utilizan para este fin son un aspecto adicional de la invención. Los reactivos inmunógenos específicos o de prueba desarrollados para este fin se caracterizan al incluir residuos alrededor del centro de bisagra de la IgG1, incluyendo pero no limitándose a los residuos SCDKHTCCPP CPAPELLGGP SVFLFP (SEQ ID NO: 1) como se muestra en la Fig. 3. Regiones de bisagra de otros anticuerpos de isotipo humanos que producen fragmentos de anticuerpos al entrar en contacto con enzimas proteolíticas también pueden servir como fuentes de analógico a efectos de crear, seleccionar o probar los anticuerpos u otras moléculas de unión a productos de escisión enzimática. Una región análoga de la IgG4 de cadena pesada humana incluye residuos TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPSCPA PEFLGGPSVF LF (SEQ ID NO: 2) y para IgG2 e IgG3 como se muestra en SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente. En cada caso, los péptidos consisten en al menos 5 aminoácidos contiguos seleccionados de las secuencias de la región bisagra IgG humana de SEQ ID NO: 1, 2, 3, o 4 que se encuentran en el lado del terminal amino de un sitio de escisión de la proteasa. En un aspecto, el inmunógeno o péptido específico utilizado para la generación de los anticuerpos comprenden al menos el centro de bisagra de la IgG1, que se define como los residuos de -T-C-P-P-C-. En una realización específica, el péptido es un péptido análogo de 12-mer de la IgG1 humana de bisagra inferior y el dominio CH2 contigua que tiene la secuencia TCPPCPPELLG (residuos 7-18 de la SEQ ID NO: 1). Un método general para la creación de fragmentos de péptidos útiles en la creación de, al seleccionar o probar los anticuerpos u otras moléculas de unión a enzimáticos productos de escisión es a) identificar el residuo terminal N de un par de residuos de una cadena pesada de anticuerpo escindido por una proteasa como se ejemplifica en proteasas específicas en el Ejemplo 1 y se muestra en la Tabla 1, b) definen a partir de 5-14 o más residuos de aguas arriba de ese sitio de escisión en el que el residuo terminal N se convierta en el extremo C de la secuencia definida y c) producir el péptido en cantidades suficientes para el/los propósito(s) deseado(s). Péptidos tales como los descritos son los seleccionados del SEQ ID NO: 5-11 o truncamientos de N terminal de los mismos. Los péptidos pueden ser etiquetados, conjugados o reticulados o utilizarse en mezcla unos con otros o con adyuvantes a efectos de la prueba de unión o como inmunógenos o paneo objetivos para su uso, por ejemplo, en la selección de aglutinantes a partir de una biblioteca de presentación de fagos.

Descritas en este documento, en un aspecto, son moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden, complementan, o hibridan con un polinucleótido que codifica los péptidos específicos antes mencionados o anticuerpos de los mismos, que comprenden al menos una secuencia, dominio, porción o variante de la misma. La presente descripción abarca ácidos nucleicos aislados que codifican al menos un anticuerpo monoclonal aislado que tiene especificidad para el scIgG como se describe en este documento y un vector de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico aislado, y/o una célula huésped procarionta o eucariota que comprende el ácido nucleico aislado. La célula huésped puede ser opcionalmente al menos una seleccionada a partir de E. Coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/O, 293, HeLa, mieloma, linfoma, levaduras, insectos o células de plantas, o cualquier derivado, inmortalizadas o transformadas de células de los mismos también se describe un método para producir al menos un anticuerpo de la divulgación, que comprende la traducción del anticuerpo de ácido nucleico codificante en condiciones in vitro, in vivo o in situ, de tal manera que el péptido o el anticuerpo se expresa en cantidades detectables o recuperables.

Métodos de uso

Los reactivos de la invención son útiles en la detección de patología de la enfermedad cuando el proceso de la enfermedad invoca, es el resultado de, causa, o está asociado de otro modo con actividad proteolítica y las enzimas proteolíticas, las proteasas. Tales enfermedades y procesos incluyen los precipitantes o agravantes, producidos por,

o como resultado de la infección, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular, infarto de miocardio y otros trastornos inflamatorios agudos y crónicos. Los solicitantes han demostrado que un biomarcador particularmente útil de la actividad proteolítica es sclgG, que se detecta en el aumento de los niveles en algunos de los trastornos mencionados anteriormente. Como se genera sclgG localmente en el sitio de la patología o proceso patológico o infección, sclgG proporciona un marcador único y específico de tales procesos como un indicador de la participación de tejidos específicos o tipos de células en el sitio de la enfermedad.

En una realización del método de la invención, se obtiene una muestra de un sujeto sospechoso de tener, después de haber tenido, o de haber sido tratado por una enfermedad caracterizada por niveles elevados de proteasas. La muestra se pone en contacto con un agente de unión, tal como una preparación de anticuerpo, que tiene especificidad por los fragmentos de escisión de IgG que se sabe resulta de contacto entre la enfermedad estimulada proteasa y una población de IgG en suero.

El método de la invención puede utilizarse para evaluar si los pacientes previamente diagnosticados con una enfermedad o condición están en riesgo de la enfermedad avanzada (por ejemplo, metástasis de cáncer, crecimiento tumoral agresivo, infección persistente, etc.).

En algunos casos, por ejemplo en el paciente de cáncer, la detección de sclgG puede ser útil para indicar la progresión de la enfermedad avanzada que implica la diseminación metastásica que implica la elaboración de enzimas proteolíticas, especialmente las MMP. En algunos aspectos, las acciones de enfermedades neoplásicas comparten estos mecanismos en general con procesos inflamatorios, la reparación de tejidos y la cicatrización (Coussens, L. M. y Werb, Z. 2002. *Nature* 420 (19): 860-867). Otros estudios han demostrado que, por ejemplo, reducción de lípidos correlatos tanto con una reducción en el riesgo de eventos cardíacos y vasculares, por ejemplo, trombosis, y con una reducción en las MMP, tales como MMP-2 y MMP-9 y que estas enzimas son producidas por las placas ateroscleróticas (Deguchi, J, Maanori, A., Ching Hsuan, T. et al. 2006 *Circulation* 114.: 555-62). Por lo tanto, los métodos de la invención son particularmente aplicables, pero no limitados a los pacientes con síndromes severos de artritis (RA, espondilitis anquilosante), ciertos tipos de cáncer (especialmente cáncer de mama inflamatorio), los ajustes arteriales coronarios graves (infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva) y otras enfermedades como el asma. El método de la invención puede ser utilizado para distinguir aquellas enfermedades y condiciones en las cuales la fisiopatología implica o induce proteasa capaz de actuar sobre IgG de otras patologías no caracterizadas por niveles elevados mejorados de proteasas secretadas o en el que las proteasas no escinden IgG.

Por lo tanto, mientras que el método de uso de los reactivos descritos en el presente documento son específicos para la detección de los fragmentos escindidos, análisis más específico de los fragmentos escindidos podría incluir un análisis de la especificidad de unión de las regiones variables del anticuerpo escindido. Por ejemplo, un ensayo en fase sólida que combina la selectividad de unión a antígeno con la detección de anticuerpos fragmentados se podría utilizar para determinar si ciertos antígenos y proteasas son colocalizados en un sujeto proporcionando así información sobre la naturaleza del tejido, la enfermedad o patología en el lugar de actividad proteolítica.

La extracción de sangre es la forma más práctica con frecuencia de muestreo de tejidos de sujetos, humanos o animales, sanos o enfermos. En la medida en que sclgG se encuentra de forma sistémica, y no se limita al sitio de la formación, es decir, el sitio de la actividad de la proteasa, que es un marcador reportero de actividad de la enfermedad que puede localizarse en compartimentos específicos. Uno de estos es el compartimiento de líquido sinovial. Así, la sangre o la colección de suero proporciona una fuente conveniente y factible para la detección temprana de la enfermedad utilizando los reactivos y métodos proporcionados por la presente invención. Alternativamente, el muestreo de los ajustes locales como líquido sinovial RA, exudados pulmonares, biopsias, y similares también se podría aplicar a los pacientes en cualquier etapa incluyendo el diagnóstico o en pacientes con enfermedad avanzada. Fragmentos de anticuerpos escindidos pueden detectarse en tales muestras de tejido por tinción directa (métodos inmunohistoquímicos) o en muestras fraccionadas derivadas de las muestras.

Las muestras de tejidos, incluyendo la sangre, deben ser tratadas con el fin de inhibir las proteasas activas residuales. La quelación de metales (por ejemplo EDTA) eficazmente inhibe MMPs. Iodoacetamida bloquea proteasas de cisteína (por ejemplo IdeS), proteasas de serina pueden ser bloqueadas con DFP y compuestos similares. Proteasas activas están presentes en el líquido sinovial y se deben procesar en consecuencia. Las muestras también se pueden mantener congeladas hasta el momento del ensayo. Una vez que las muestras se han procesado apropiadamente, los reactivos específicos sclgG de la invención pueden ser utilizados en cualquiera de las técnicas basadas en anticuerpos, tales como ELISA, formatos basados en talón, RIAs, conocidos por los expertos en la técnica o aún por desarrollar.

Los reactivos de fragmentos de escisión proteolíticos anti IgG de la invención pueden ser envasados en un kit para la investigación o el uso de diagnóstico y para la venta comercial, junto con otros reactivos tales como tampones y estándares como IgG humana intacta y cantidades conocidas de IgG escindida junto con instrucciones para la medición y, si se desea, la cuantificación de fragmentos de escisión proteolíticos de IgG en muestras de tejido cosechadas de los sujetos.

Los anticuerpos de la invención inmunoespecíficos para fragmentos de la escisión del péptido de la bisagra son

capaces de unirse a los restos de IgG enzimáticamente escindida que retienen dominios de unión a antígeno, por ejemplo Fab, F(ab')₂, sclgG, y así restaura las características de unión relacionadas a Fc y funciones efectoras concomitantes, proporcionando una región de Fc intacta. Por lo tanto, los anticuerpos creados por los métodos enseñados en el presente documento o que tiene la propiedad de unirse a fragmentos de anticuerpos creados enzimáticamente in vivo pueden ser útiles como moléculas terapéuticas. Los anticuerpos de fragmentos de escisión de anti IgG de la presente invención se pueden usar para tratar a los pacientes en los que una enfermedad caracterizada por la escisión proteolítica inducida por enfermedad de IgG. En un aspecto, los anticuerpos de fragmentos de escisión anti IgG se pueden utilizar para restaurar las funciones efectoras a fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unión específica a diana.

Al describir la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se describirán en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1: ANÁLISIS DE ESCISIÓN DE LA CADENA PESADA DE IgG HUMANA

Se estudió la proteólisis de la cadena pesada de IgG humana por metaloproteinasas de la matriz, catepsinas, elastasa de neutrófilos humanos (HNE), y enzimas de patógenos seleccionadas, tales como endopeptidasa de glutamilo de estafilococos (proteasa V8), y la enzima degradante de inmunoglobulina de estreptococos (IdeS).

Se puso en contacto un anticuerpo monoclonal purificado que comprende una cadena pesada de IgG humana con las proteasas descritas y el muestreo se llevó a cabo a través de varias duraciones de contacto. La fragmentación en las muestras se evaluó usando la tecnología microfluidica "laboratorio en un chip" Agilent para biodimensionamiento in vitro (Goetz H et al. Biochemical and Biophysical Methods 60; 281-293, 2004).

Sustratos de anticuerpos. Anticuerpos monoclonales eran o anticuerpos completamente humanos, anticuerpos murinos recombinantes humanizados o anticuerpos quiméricos humanos/murinos que tienen dominios constantes humanos y las regiones de bisagra de la clase/subclase IgG1kappa y especie: Mab1 es una IgG1 humana que une un patógeno, Mab2 (anti-citoquina) es un anticuerpo humano/murino quimérico de IgG1 que posee regiones constantes humanas y dominio de bisagra, y Mab3 es una IgG1 humanizada de CDR injertada. Todos los anticuerpos contienen una cadena ligera kappa.

Enzimas proteolíticas y los métodos de control. Pro-MMP-2, MMP-7 y pro-MMP-9 humanas se obtuvieron de Chemicon Internacional (Temecula, CA) y se activaron mediante incubación con 1 mM acetato de p-aminofenilmercurico (APMA; CalBiochem, San Diego, CA) durante 16 h a 37°C antes de su uso (Marcy et al., 1991). Recombinante humana activa MMP-12 se obtuvo de R&D Systems. Recombinante MMP-1 era un generoso regalo del Dr. Hidcaki Nagasc. pro-MMP-3 humana se expresó transitoriamente en células HEK con una etiqueta de histidina en el lugar de los dominios de bisagra y de hemopexina. La variante pro-MMP-3 se activó por incubación a 55°C durante 25 minutos como se describe (Koklitis et al., 1991). Catepsinas B, D, G, S y proteinasa 3 se obtuvieron de Athens Research & Technology (Athens, GA). La coagulación de enzimas de trombina, F.Xa, F.IXa, F.XIIa y kallekrein, así como la plasmina y plasminógeno, fueron adquiridos de Enzyme Research Laboratories (South Bend, TN). El activador del plasminógeno tisular (Activasa) era un producto de Genentech (South San Francisco, CA). La estreptoquinasa y la proteína C activada se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Estafiloquinasa se obtuvo de Affinity BioReagents (Golden, CO). El estafilococo aureus V8 glutamilo endopeptidasa I se obtuvo de Pierce Biotechnology (Rockville, IL). La inmunoglobulina recombinante de la enzima degradante de Streptococcus pyogenes (IdeS) fue proporcionado por el Dr. Lars Bjorck de la Universidad de Lund (Lund, Suecia).

Digestiones de proteinasa de las IgG purificadas se llevaron a cabo a pH 7,5 en salino de fosfato tamponado (PBS) o, para las metaloproteinasas, en tampón de solución salina de tris tamponada a 37°C. El cloruro de calcio se incluyó en las reacciones de la metaloproteinasas en 1 mM de MMP-12 y 10 mM para MMP-3; de lo contrario no se utilizaron aditivos. Las concentraciones de anticuerpos eran típicamente 1 o 2 mg/ml y las reacciones se iniciaron por adición de enzima a un 1% ratio (en peso) para IgG. Alicuotas (10-20 µL) se retiraron en los tiempos indicados y las reacciones se detuvieron ya sea por ajuste de 20 mM EDTA (incubaciones de metaloproteinasas) o a 1 mM iodoacetamida (proteinasas de cisteína) o mediante congelación rápida.

Las principales posiciones de escisión proteolíticas en la bisagra de IgG1 se identificaron para los fragmentos de la enzima generada por secuenciación N-terminal del fragmento de Fc purificado (MMP-3 y MMP-12) y/o análisis espectrométrica de masas de alta resolución de la Fab purificada (elastasa de neutrófilos, plasmina) y fragmentos de F(ab')₂ (catepsina G, endopeptidasa de glutamilo y IdeS). La fragmentación se evaluó usando la tecnología "laboratorio en chip" microfluidica Agilent.

Resultados. Una lista de proteinasas que se examinaron y los resultados del análisis de los productos primarios de la escisión proteolítica de IgG1 humana se presenta en la Tabla 1. Varias enzimas no fragmentan IgG1 en las condiciones utilizadas. Entre las proteinasas activas, las actividades específicas relativas en las condiciones descritas eran: IdeS > MMP-12 > MMP-3, endopeptidasa de glutamilo > elastasa de neutrófilos > catepsina G, plasmina > MMP-2, MMP-9 > MMP-7.

La Figura 2 representa análisis de biodimensionamiento de IgG antes y durante el tratamiento de la enzima proteolítica. MMP-3, endopeptidasa de glutamilo I y IdeS se observa cada uno a la escisión IgG1 en una forma escalonada (Figuras 2A, 2B y 2C, respectivamente). En cada caso, un intermedio temprano de aproximadamente 135.000 Da se generó, convirtiéndose posteriormente en una especie de aproximadamente 100.000 Da. Un fragmento de aproximadamente 35 kDa, presumiblemente el monómero de Fc, también formado durante estas reacciones. El peso molecular (35 kDa) calibrado por la migración de gel es mayor que la predicha por la secuencia de aminoácido de fragmento de la cadena pesada que sería residuos de entre 211 a 215 (entre los residuos 232 y 237 al residuo 447^a en el extremo C-terminal de la cadena pesada) pero consistente con el fragmento que contiene el sitio de glicosilación en el dominio CH2. La desaparición de la IgG intacta (160.000 Da) tuvo lugar durante un período de varias horas con MMP-3 y endopeptidasa de glutamilo I, y dentro de un minuto o menos con IdeS bajo estas condiciones. Todas las digestiones se llevaron a cabo en condiciones comparables como se describe.

Se encontró que el intermedio 135 kDa resulta de una única escisión proteolítica en una de las cadenas pesadas en el dominio de bisagra inferior. En condiciones no desnaturalizantes, el intermedio es indistinguible de la IgG intacta en ciertas propiedades físicas, tales como la migración en la cromatografía de exclusión por tamaño (datos no mostrados). Sin embargo, en geles de SDS, y el actual sistema de electroforesis microcapilar, el fragmento de escisión de la región Fc (dominios CH2-CH3 de la cadena pesada) se separa del resto de la estructura para revelar el tamaño reducido intermedio (135 kDa). El tamaño de esta especie es consistente con una IgG individualmente escindida según lo informado por Gearing (2002 *supra*). La incubación extendida de IgG1 con las tres enzimas resultó en la conversión de la scIgG intermedia al fragmento F(ab')₂ y Fc.

Entre las enzimas que exhiben la capacidad de escindir la IgG1 de los diferentes sustratos a base de IgG1 monoclonales ensayados, se encontró consistentemente que la escisión inicial al intermedia de escisión única era relativamente rápida, y se requiere tiempos prolongados para la segunda hendidura a F(ab')₂ que se produzca. También mostrado en la Figura 2D es un compendio de Mab1 con elastasa de neutrófilos humanos (HNE). HNE difería de las tres enzimas anteriores en que se escinde IgG en la bisagra superior para producir el fragmento Fab y un dímero Fc enlazado a disulfida correspondiente.

Las principales posiciones de escisión proteolítica en la bisagra IgG1 se identificaron para el fragmento de Fc purificada (MMP-3 y MMP-12) y/o análisis de espectrometría de masas de alta resolución de la Fab purificada (elastasa de neutrófilos, plasmina) y fragmentos de F(ab')₂ (catepsina G, endopeptidasa de glutamilo y IdeS). La secuencia de aminoácidos de la región de bisagra humana IgG1 se presenta en la Figura 3, con las posiciones identificadas de escisiones enzimáticas indicadas. La digestión extendida con proteinasas que escinden en la bisagra superior produjo dos fragmentos Fab; enzimas que escinden en la bisagra inferior (por debajo de los enlaces de disulfuro de centro de bisagra) produjo F(ab')₂s.

El sitio dominante de escisión enzimática se identificó o confirmó para cada enzima incluyendo MMP-3 humana y -12, la catepsina G humana, HNE humana, endopeptidasa de glutamilo estafilocócica I y IdeS estreptocócicas basadas en el análisis tanto de los residuos terminales carboxi y amino en el F(ab')₂ o fragmento Fc, respectivamente (Tabla 1). Se observaron sitios de escisión secundarios en algunas aceleraciones durante las incubaciones prolongadas (por ejemplo, la catepsina G y HNE), y era dudoso si estos son sitios de escisión alternativos para la proteinasa indicada o el resultado de contaminantes menores, de proteinasas en estas preparaciones de enzimas. Los sitios de escisión MMP-12 y HNE en IgG no han sido objeto de informe anteriormente. Para otras proteinasas, las principales posiciones de escisión de IgG identificadas se correspondían con resultados previamente informados (Chuba, 1994; Diemel et al., 2005; Gearing et al., 2002; Vincents et al., 2004; Yamaguchi et al., 1995).

Las posiciones de escisión difieren ligeramente entre las enzimas; con la proteólisis que ocurre después de la prolina-245, ácido glutámico-246 y glicina-249 para MMP-3, V8 y IdeS, respectivamente. Estas diferencias en la posición de escisión no impactan el peso molecular detectable mediante el sistema de biodimensionamiento electroforético microcapilar (Agilent Technologies). Tiempos de incubación más largos con MMP-3, V8 y IdeS permiten la conversión completa a F(ab')₂. La digestión de IgG1 por HNE se diferencia de las otras proteasas al escindirse ante los disulfuros de bisagra de núcleo (cisteínas 238 y 241) a histidina 236 para dar un producto Fab y Fc enlazado a disulfuro (véase Fig. 2D).

Los sitios de escisión se basan en la numeración de UE y se refieren a los residuos que se muestran en la Fig. 3 y SEQ ID NO: 1 que abarca desde Ser²¹⁹ a través de Phe²⁴³ de un anticuerpo de clase IgG1 humana. Varias proteasas escindieron IgG1 debajo del dominio de bisagra, y produjo fragmentos de F(ab')₂ de longitudes ligeramente diferentes (que abarcan Ala²³¹ a Gly²³⁷). Muchas de las proteinasas de degradación de IgG caracterizadas en este estudio se han reportado estar expresadas, o ser abundantes, en sitios de inflamación (HNE, catepsina G, MMP-12), en el entorno de tumor o de la cicatrización de heridas (MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, plasmina), y en los sitios de infección (endopeptidasa de glutamilo, IdeS) (Dollery et al., 2003; Kilian et al, 1996; Rooijackers et al, 2005; Schönbeck et al., 1999; Shapiro, 1999; Sukhova et al., 1998; van Kempen et al., 2006; Vincents et al, 2004)) Para muchos casos, es poco probable que la expresión extracelular de proteinasas específicas se dirige principalmente hacia anfitrión IgG. Más bien, su elaboración se asocia con la fisiología de la enfermedad (por ejemplo, metaloproteinasa de matriz en el ambiente del tumor). Sin embargo, estos estudios de degradación de anticuerpos

de enzima/monoclonales in vitro purificados indicaron que las IgG humanas no son resistentes a una serie de proteasas con potencial relevancia para la enfermedad humana.

Para las enzimas que convierten IgG1 a F(ab')₂ (la mayoría), las divisiones eran altamente específicas y autolimitantes (a diferencia de la digestión de pepsina que reduce el dominio Fc a pequeños péptidos). Con la excepción de IdeS, las tasas de escisión de IgG1 con la mayoría de estas proteinasas extracelulares fueron en general más lentas que la observada con pepsina en sus condiciones óptimas (por ejemplo pH 4,0). La fragmentación proteolítica a F(ab')₂ procedió a través de intermediarios escindidos individuales en un proceso de dos pasos. El intermedio único escindido de IgG1 se propuso anteriormente como posible intermedio durante la digestión de IgG con MMP-3 (Gearing et al., 2002) y con IdeS (Vincent et al., 2004). En los presentes estudios, se observó consistentemente que la primera escisión del intermedio de escisión única se produjo de forma relativamente rápida en comparación con la segunda hendidura, escisión más lenta que produce F(ab')₂. Los estudios aquí se centraron en IgG1 porque es el isotipo predominante de IgG en circulación humana. Un número limitado de otros experimentos de isotipo humano se llevaron a cabo para determinar susceptibilidades la MMP-3 y IdeS. En éstos, se observó que IgG4 fue comparable en la susceptibilidad a IgG1, mientras que IgG2 e IgG3 eran más resistentes en estas condiciones (datos no mostrados). Investigaciones comparables de degradación IgA, IgM, IgE, IgD no se hicieron.

Toda la información se resume en la Tabla 1, donde "Proteinasas de coagulación" incluyen F.XIIa, FIXa, F.Xa, la trombina y la proteína C activada; plasmina era plasminógeno coincubado con activadores del plasminógeno; tPA, estreptoquinasa y estafiloquinasa; "activadores de plasminógeno solos" son sin plasminógeno; y las MMPs eran proteinasas recombinantes obtenidas, ya sea como forma activa o proenzima como se ha detallado en los Materiales; y "Ninguno" no denota ninguna ruptura detectable en 24 horas. Salvo donde se ha indicado, todas las enzimas eran humanas. Las designaciones de los restos son del sistema de numeración UE para el anticuerpo de cadena pesada de IgG1, donde los 25 residuos de SEQ ID NO: 1 corresponde a los residuos 219 a través de 243 de la cadena pesada madura completa.

Tabla 1.

Enzima	Fuente	Tipo de Proteinasa	Asociación de Enfermedad (Ref)	Sitio de Escisión	Producto Mayor
Catepsina G	Gránulos de Neutrofilo Humanos	Endopeptidasa de Serina	Enfisema, IPF, RA (2,3)	Glu ²³³ -leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc
Cathepsin B	"	"			Ninguno
Cathepsin D	"	"			Ninguno
Elastasa de Neutrofilo (HNE, elastasa de leucocito, elastasa de PMN)	" neutrofilos	"	Amiloidosis, enfisema de pulmón, fibrosis cística, ARDS, RA, invasión de tumor (2,3)	Thr ²²³ -his ²²⁴	Fab + Fc
Elastasa Pancreática	618 129 464 gema		Pancreatitis (3)		
Proteinasa 3 (mieloblastina)	"	"			Ninguno
Triptasa	" Mastocitos	9	Anafilaxis, fibrosis (2)		Ninguno
Quimasa	" Mastocitos	"	Inflamación, enfermedades cardiovasculares (2,3)		Ninguno
Calicreína	"	"			Ninguno
Proteinasas de Coagulación	"	"			Ninguno
Plasmina (fibrinolisisina)	"	"	Migración de células (p.ej.tumores)(2)) infección de estreptococo (6)	Lys ²²³ -thr ²²⁴	Fab + Fc
Activadores de plasminógeno solos	"	"			Ninguno
Colagenasa Intersticial (MMP-1)	Human (fibroblastos condrocitos,	Metaloendopeptidasa	RA, OA, IBD, IPF, aneurismas (1)		Ninguno
Gelatinasa A (MMP-2)	" Células del tumor, fibroblastos	"	Tumores invasivos (1)	Glu ²³³ -leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc
Stromelisina (MMP-3)	" fibroblastos, condrocitos, osteoclastos, macrofagos	"	RA, OA, placa aterosclerótica, enfermedad de Crohn, colitis, algunos tumores (1,4)	Glu ²³³ -leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc

5

Continua)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Enzima	Fuente	Tipo de Proteinasa	Asociación de Enfermedad (Ref)	Sitio de Escisión	Producto Mayor
Matrilisina (MMP-7)	" células epiteliales glandulares		Tumores invasivos (1,4)	Leu ²³⁴ - leu ²³⁵	F(ab') ₂ + Fc
Colagenasa 2 (MMP-8)	" neutrófilos		Inflamación, RA, OA (1, 4)		Ninguno
Gelatinasa B (MMP-9)	" células normales y de tumor, monocitos activados, células T neutrófilos	"	Inflamación, aneurismas aórticos, ARDS, bums RA > OA, infiltratos de tumor de células inflamatorias (1,4)	Leu ²³⁴ - leu ²³⁵	F(ab') ₂ + Fc
MetaloeLASTASA de macrófago(MMP-12)	" macrófago	"	Inflamación, destrucción de tejido cuando sobrexpresado, aneurismas, placa aterosclerótica (1)	Pro232-	F(ab') ₂ +
Catepsina S	"	Endopeptidasa de cisteína			None
Endopeptidasa de Glutamilo I (Glu V8 proteasa)	<i>Staph.</i> <i>aureus</i>	Endopeptidasa de Serina	Infección de <i>Staph. Aureus</i> (2)	Glu ²³³ - leu ²³⁴	F(ab') ₂ + FC
Enzima de degradación de inmunoglobulina		Endopeptidasa de serina	Infección de <i>Strep.</i> <i>Pyogenes</i> (5)	Gly ²³⁶ - gly ²³⁷	F(ab') ₂ + Fc
<p>(1) Barrett A. J., Rawlings N. D. y Woessner J. F. (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2004.</p> <p>(2) Barrett A. J., N. D. Rawlings y Woessner J. F. (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2004.</p> <p>(3) Powers, J.C.. "Proteolytic Enzymes and Disease Treatment" 1982. In: Feeney y Whitaker (eds). Modification of Proteins: Food, Nutritional and Pharmacological Aspects. Advances in chemistry Series 198. ACS, Washington, DC 1982 pp 347-367.</p> <p>(4) Tchetverikov I., Ronday H.K., van El B., Kiers G.H., Verzijl N., TeKoppele J.M., Huizinga T.W.J., DeGroot J. y Hannemaaijer R., 2004. MMP Profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. Ann.Rheurn.Dis. 63, 881-883.</p> <p>(5) Vincents B., von Pawel-Rammingen U., Björck L. y Abrahamson M., 2004. Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidasa, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding. Biochemistry 43, 15540-15549.</p> <p>(6) Sun H., Ringdahl U., Homeister J.W., Fay W.P., Engleberg N.C., Yang A.Y., Rozek L.S., Wang X., Sjobring U., Ginsburg D., 2004. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. Science. 305, 1283-1286.</p>					

65

EJEMPLO 2: ESCISIÓN DE IgG EN UN EXUDADO INFLAMATORIO

Se espera que los exudados inflamatorios y otros tales fluidos que poseen enzimas proteolíticas asociadas con la inflamación y la cicatrización de heridas. Para este propósito, las muestras de fluido de la herida se obtuvieron de Ethicon Inc.

5 En primer lugar, un sustrato de anticuerpo, que comprende dominios de cadena pesada humana constantes, se biotiniló al azar. Diez microlitros del anticuerpo de sustrato biotinilado se añadió a 190 microlitros de fluido de la herida y se incubaron a 37°C durante 8-24 horas. En tiempos especificados, se retiraron muestras. La IgG de partida y las muestras de los diferentes tiempos se aplicaron en pocillos separados de un gel de Bis-Tris de 4-12% y se sometieron a SDS PAGE. Las bandas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y, tras el bloqueo con solución salina tamponada de 0,1 M Tris que contiene 0,1% de Tween 20 y 10% de leche de grado de bloqueo ("Blotto"), el blot se desarrolló utilizando reactivo de peroxidasa de rábano picante AVIDIN-D seguido de sustrato TMB (membrana).

15 Como lo demuestra el imagen gel que se muestra en la Figura 4, hubo una pérdida de IgG intacta por 8 hr y la aparición de bandas similares en tamaño a estándares F(ab')₂ y Fab. Los resultados de este experimento indican que la proteólisis de IgG por las enzimas en un fluido inflamatorio se produce durante un período de varias horas y produce fragmentos que se corresponden con fragmentos producidos por proteólisis in vitro con enzimas purificadas.

EJEMPLO 3: PREPARACIÓN DEL REACTIVO

20 La determinación de la presencia de fragmentos de anticuerpos anfitrión (paciente) producidos por proteasas endógenas requiere un reactivo que se une selectivamente a la IgG escindida pero no IgG intacta. Tanto la identificación del componente escindido y una diferencia cuantitativa entre el contenido de fragmento en las muestras de pacientes con enfermedad en comparación con la población normal debe ser capaz de evaluarse usando el reactivo.

25 La detección de cantidades pequeñas desconocidas, pero probables, de fragmentos de IgG en soluciones que contienen concentraciones relativamente altas de IgG intacta es difícil. Aunque sclgG ha sido señalado como un posible fragmento de escisión de IgG (Gearing 2002 supra), la cuantificación en muestras humanas no se ha realizado previamente. Para este propósito, un reactivos con la especificidad necesaria se generaron en conejos que tienen un alto grado de especificidad para IgG escindida pero no intacta.

35 Tres análogos peptídicos conjugados de cadena, y progresivamente más sencillos de la bisagra de IgG1 humana se utilizaron para la inmunización (en Invitrogen Corporation). Un péptido 8-mer correspondiente a la secuencia de aminoácidos en el lado amino terminal del sitio de escisión de MMP-3 se une covalentemente a hemocianina de lapa californiana (KLH) a través del terminal N (TCPPCPAP, residuos 7 a 14 de la SEQ ID NO: 1). Péptidos extendidos correspondientes al sitio de endopeptidasa de glutamilo (TCPPCPAPE, residuos 7 a 15 de la SEQ ID NO: 1) y el sitio IdeS (TCPPCPPELLG, residuos 7 a 18 de la SEQ ID NO: 1) se prepararon por separado como inmunógenos. Conejos de Nueva Zelanda (dos por inmunógeno) se inmunizaron por inyección subcutánea de 0,2 mg de péptido conjugado en adyuvante completo de Freund y reimpulsaron tres veces más con antígeno 0,1 mg en adyuvante incompleto de Freund en los días 14, 42 y 56. El suero se recogió en 4, 8 y 10 semanas y se agruparon por inmunógeno para la purificación de anticuerpos. Los títulos inmunes fueron supervisados por ELISA basada en péptido antígeno en fase sólida.

45 La purificación por afinidad de anticuerpos empleados los antígenos peptídicos respectivos inmovilizados sobre un soporte activado. El antisuero de los dos conejos inmunizados con el mismo antígeno se reunió y se pasó a través de la columna del antígeno después de lo cual la columna se lavó extensamente. Los anticuerpos específicos se eluyeron como de baja afinidad y estanques de alta afinidad utilizando 3M KSCN y 0.1M glicina, pH 2,5, respectivamente. Los dos estanques produjeron características indistinguibles de unión y se usan de manera intercambiable y/o agrupadas. Los tres estanques eluidos por separado de anticuerpos unidos se somete después a una segunda etapa de adsorción por afinidad, esta vez en una columna que contiene un anticuerpo intacto que comprende regiones constantes de IgG1 humana de cadena pesada (Mab3). La intención de la segunda etapa de cromatografía de afinidad era para eliminar los anticuerpos no deseados que podrían reconocer IgG intacta. Sin embargo, poco o ningún anticuerpo de conejo se adsorbió a la columna IgG que sugiere que la población de anticuerpos era reactiva solamente con la secuencia de "escindido" con su extremo de carboxilo terminal expuesto.

55 Los anticuerpos anti péptidos de conejo de afinidad purificada individuales se ensayaron para determinar su capacidad para unirse a fragmentos generados enzimáticamente de IgG humana, así como IgG intacta por ELISA (Fig. 5). Los anticuerpos purificados a partir de los conejos inmunizados con KLH conjugada con residuos 7 a 14 de la SEQ ID NO: 1 (el análogo de sitio de MMP-3) no se unen de IgG intacta y eran altamente específicos para sclgG y F(ab')₂ producida por la digestión de IgG con MMP-3. Esta preparación de anticuerpos mostraron reactividad mínima a sclgG y F(ab')₂ producida con proteasa de V8 o IdeS. En contraste, los anticuerpos obtenidos a partir de conejos inmunizados con el análogo de péptido de bisagra de sitio de escisión V8 (residuos 7 a 15 de la SEQ ID NO: 1) y los análogos de péptido de bisagra de sitio de escisión de IdeS (residuos 7 a 18 de la SEQ ID NO: 1) mostraron un perfil de unión reactivo cruzado para sclgGs y F(ab')₂ producida por cualquiera de estas dos enzimas. Sin embargo, estas preparaciones mostraron reactividad mínima para los productos digeridos MMP-3. Ninguna de las preparaciones de

anticuerpos unidos a IgG intacta y ninguno de los preparados de anticuerpos era comparablemente reactivo con fragmentos, incluyendo $F(ab')_2$ y sclgG, producidos por tres enzimas diferentes, como se muestra en la Figura 6.

5 El uso previsto del reactivo anti bisagra es la detección de sclgGs y $F(ab')_2$ (y otros fragmentos potenciales) que se producen en complejo en los entornos in vivo por enzimas presentes en tejidos específicos de la enfermedad o producida por tipos de células específicas de la enfermedad o poblaciones de células, por ejemplo la infiltración de macrófagos o neutrófilos. Para una cobertura óptima de los fragmentos potenciales de IgG, se consideró preferible tener un perfil tan amplio de reconocimiento de sitio de escisión como sea posible. Por esta razón, una mezcla de cada uno de los tres conjuntos de anticuerpos de conejo se preparó a 0,33 mg/ml de cada componente (total = 1 mg/ml) para su uso en la transferencia Western posterior y pruebas de ELISA basadas en suero. Este reactivo combinado se conoce como RAH-1.

15 **EJEMPLO 4: ENSAYO DE INMUOGLOBULINA DE ESCISIÓN DE CADENA ÚNICA**

15 El ensayo novedoso empleado para detectar sclgG en suero usando, como un reactivo de captura, la RAH-1 capaz de unirse a IgG humana pero IgG no escindida intacta humana se describe en detalle como sigue.

20 El uso de ELISA de Quimioluminiscencia, regiones de placas de 96 pocillos de Quimioluminiscencia Nunc se recubrieron con RAH-1 a 10 mg/ml en PBS. El resto de la placa se dejó sin recubrir (1X PBS solo). Las placas se incubaron a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron y se añadieron 200 ml/pocillo de ChemiBLOCKER de Chemicon International (C# 2160) a las placas y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. El tampón de bloqueo se aspiró de los pocillos y se añadieron los estándares y las muestras a la placa. El estándar Mab3, sclgG digirió con V8, se añadió por duplicado a partir de 50 mg/ml en PBS que contenía 1% de caseína y 3% de BSA usando cuádruples en serie diluciones. Se añadieron las muestras de suero de la enfermedad a una dilución 1:50 en el mismo tampón. Las placas se lavaron y una dilución 1:6000 de IgG humana (H+L) de burro fragmento conjugado AffiniPure $(Fab')_2$ HRP de Jackson Immuno Research, que tiene reactividad cruzada mínima a diversos animales, incluyendo el conejo, se añadió a todos los pocillos. Esto se añadió en una dilución de PBS con 1% de caseína y 3% de BSA y se incubó a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron a fondo y 100 ml/pocillo de sustrato HRP (de Roche BM quimioluminiscencia POD, 582 950) se añadió segundos antes de leerse la placa en el lector luminiscente.

35 La luminiscencia media de los pozos 0 ng/ml sclgG sobre la curva estándar se restó de todos los pocillos que fueron expuestos a la capa RAH-1. Esta sustracción controla por cualquier reactividad no específica de la secundaria con la RAH-1. A continuación, el valor de cada donante en pocillos recubiertos no RAH se restó del valor previamente ajustado de los pozos recubiertos RAH. Esto explica cualquier reactividad no específica en el suero a la placa.

40 **EJEMPLO 5: USO DE REACTIVOS PARA DETECTAR ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE ENFERMEDAD ASOCIADA**

40 El reactivo RAH-1 se ensayó para determinar su capacidad para detectar fragmentos de IgG en otro fluido inflamatorio, el fluido sinovial de un paciente con artritis reumatoide (RA).

45 Una colección de muestras de líquido sinovial de pacientes con AR fue adquirida comercialmente de Bioreclamación. Las muestras se diluyeron 1:5 en tampón de muestra LDS y 10 μ ciroL de cada muestra se cargaron en un gel de Bis-Tris de 12-4%. Como control para la reactividad de RAH-1, IgG intacta (Mab3), o proteasa digieren IgG (digestiones parciales de Mab3 con MMP-3, endopeptidasa de glutamilo y IdeS) se cargaron en el gel también. Después de SDS PAGE, el gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con Blotto. A continuación, la membrana se incubó con una dilución 1:2500 de la RAH-1 en Blotto, se lavó con solución salina tamponada de 0,1 M Tris, pH 7,5 que contiene 0,1% de Tween 20 y se incubaron con una dilución 1:5000 de IgG de conjugado de peroxidasa de rábano picante de cabra anti conejo (H&L). La mancha fue desarrollada utilizando la membrana TMB. Como se muestra en la Figura 7, la preparación RAH-1 no reaccionó con la IgG intacta, pero detecta sclgG, $F(ab')_2$, posiblemente, Fab' a partir de los 3 digestiones de proteasa. Para todas las cinco muestras de líquido sinovial de pacientes con AR, se detectó una banda con el tamaño aproximado de sclgG, $F(ab')_2$ y Fab', lo que sugiere que estos fragmentos proteolíticos estaban presentes en el líquido sinovial de los individuos con AR.

55 **EJEMPLO 6: USO DE REACTIVO PARA MONITORIZAR LA ENFERMEDAD**

60 El plasma sanguíneo o suero es una forma más cómoda para las pruebas de biomarcador que los fluidos biológicos o extractos de tejidos, tales como el líquido sinovial. Sin embargo, la ventaja de líquido sinovial es que es un entorno independiente y local en el que las proteasas son actiaos y en el que se podría esperar que los fragmentos de IgG se acumulen como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, la facilidad y la prevalencia de suero para la prueba hace que sea una muestra de tejido considerablemente más probable de biomarcadores, incluyendo productos de degradación IgG.

65 Antes de iniciar la prueba de fragmentos de IgG en diferentes tipos y fuentes de suero, era conveniente establecer cuáles de los fragmentos de IgG proteolizados circularía por un período suficiente para permitir su acumulación y

cuantificación. Para responder a esta pregunta, un estudio farmacocinético comparativo fue diseñado. El siguiente experimento PK en ratones fue modelado en varios estudios similares de informes anteriores en los que las IgG humanas en general, presentan vidas medias terminales de 10 y 20 días.

- 5 Productos de proteólisis fraccionada, Mab2 IgG1, y la scIgG y F(ab')₂ generados con MMP-3, se prepararon como sigue. Una cantidad de 20 miligramos de Mab2 IgG se digirió con calor activado MMP-3 como se describe en el Ejemplo 1. La digestión se inició por adición de enzima a una solución de 4 mg/ml de Mab2 en salina tamponada tris que contiene 10 mM de CaCl₂, pH 7,5 a 37°C. La reacción se terminó por la adición de EDTA a una concentración final de 20 mM a las 48 horas. No había IgG intacta residual y el porcentaje de scIgG, F(ab)₂ y Fc fue 24%, 41% y 36%, respectivamente, basado en análisis de biodimensionamiento Agilent (8862-67). El digesto terminado se sometió a una purificación en dos etapas para eliminar el fragmento Fc y para separar scIgG purificada y F(ab)₂. En la primera etapa, el producto de digestión se sometió a cromatografía usando proteína A-Sefarosa. El material no unido de la columna contenía fragmento F(ab)₂ y ninguna IgG intacta detectable o scIgG. El tratamiento de la columna con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5, dio como resultado la elución de una mezcla de componentes que contienen Fc, el fragmento de Fc y scIgG. Las fracciones se neutralizaron inmediatamente a pH 7 por la adición de volumen 1/10 de 2M Tris, pH 7,0. El material neutralizado se concentró hasta aproximadamente 1mL y se dializó en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,5. El fragmento de Fc fue separado de scIgG por cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200 (volumen de columna = 100mL). Dos picos eluidos de la columna, que se identificaron posteriormente usando la técnica de biodimensionamiento Agilent descrita anteriormente como 135 kDa conforme a la posición de la banda de gel scIgG y un pico de peso molecular inferior identificado como el fragmento monómero Fc de aproximadamente 35 kDa. La scIgG purificada y componentes de F(ab)₂ se ponen en contacto con ActicleanEtox (0,5mL de gel por 5 mL de cada solución de proteína) para reducir la endotoxina a especificaciones AALAC para la inyección intravenosa permisible en ratones (<40 EU/kg).
- 25 Para este estudio, la cantidad equivalente de miligramo (1,9 mg/kg) de anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano intacto, Mab2 IgG1, y la scIgG y F(ab')₂ generada con MMP-3 se ensayó como se describe a continuación.

Un grupo de veintiún ratones hembra Balb/c (animales Ace) se utilizaron para el estudio farmacocinético. Hemorragias terminales fueron tomadas a través de punción cardíaca a partir de tres ratones seleccionados al azar antes del experimento para servir como controles de referencia. Los dieciocho ratones hembra Balb/c restantes se pesaron y se colocaron en seis grupos iguales. Dos grupos fueron inyectados con MAB2 IgG1 intacta, dos grupos con MAB2 scIgG1 producida con MMP-3 y dos grupos con MAB2 F(ab')₂ producida con MMP-3. Todas las inyecciones fueron i.p. en un volumen de dosis constante de 10 ml/kg en base al peso animal individual en 0,19 mg/ml. Por lo tanto, cada animal recibió una dosis de 1,9 mg/kg en el día cero. Se recogieron aproximadamente 80 ul de sangre en 1 h, 24 h, 7 d, 21 d, 35 d del primero de los dos grupos y en 5 h, 48 h, 14 d y 28 d del segundo grupo. Las muestras de suero se almacenaron a 20°C hasta el ensayo.

Las concentraciones de fragmentos de IgG e IgG del suero recogido se cuantificó a través de ensayo inmunoenzimático (ELISA). A 0,5 ug/ml de dilución en PBS de Jackson Immuno-research: IgG anti humana de cabra, fragmento F(ab')₂ específico (con reactividad cruzada mínima a proteínas bovinas, de caballo y suero de ratón) se utilizó para recubrir placas Costar 3369. Las placas se bloquearon con PBS/caseína/BSA. Tras bloqueo, estándares y muestras se añadieron en PBS/1%/caseína/3%BSA. Estándares incluyeron diluciones en serie de los siguientes: una IgG1 murina/humana, scIgG1 MMP-3 murina/humana o F(ab')₂ MMP-3 murina/humana a partir de 1,000 ng/ml. Cada muestra de punto de tiempo se diluyó en serie de 1:10 a 1:163.840 en PBS/1% caseína/3%BSA. IgGs humana unida a las placas recubiertas con anticuerpo de captura antihumana se detectaron con 50ul/pocillo Jackson Immuno-research: IgG antihumana de cabra (H+L) (con reactividad cruzada mínima a proteínas bovinas, de caballo y suero de ratón; 109-035-083) e incubar durante una hora a RT. Las placas se lavaron a fondo y se expusieron a 50ul/pocillo O-fenilendiamina sustrato durante aproximadamente 10 minutos y se detuvieron con 50 ul/pocillo 3M HCL y se leyó a 490-650 nm. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Los resultados del experimento de ratón PK indican que la scIgG posee un tiempo de vida de circulación prolongado, pero que la F(ab')₂ no lo hace. El aclaramiento muy rápido de F(ab')₂ en los ratones es coherente con la rápida desaparición de este fragmento en los seres humanos (Roskos LK et al. Drug Dev. Res. 61: 108 a 120, 2004). Estos resultados apuntan a scIgG como el componente proteolítico más abundante, de larga vida, y útil de IgG a efectos de biomarcadores.

EJEMPLO 7: ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN ENFERMEDAD

Para que la scIgG sea un biomarcador de enfermedad útil, debe exhibir cantidad diferencial en muestras obtenidas de pacientes en categorías de enfermedades definidas en comparación con las personas sanas.

Una fuente comercial de suero de individuos enfermos se identificó como Genomics Collaborative (ahora SeraCare Life Sciences Inc.). Se adquirieron volúmenes pequeños (300 microL) de suero de 10 individuos diferentes dentro de cada una de las enfermedades 8. Las categorías de enfermedad era la artritis reumatoide, la osteoartritis, el asma, la diabetes de tipo 1, el cáncer de mama, cáncer de pulmón, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva. Además, el suero de 28 voluntarios sanos normales emparejados por edad y sexo se obtuvieron de este proveedor

como controles.

Usando el ensayo como se describe en el Ejemplo 4, se analizaron las muestras y los resultados mostrados en la Fig. 9. El ensayo, basado en la selectividad del reactivo RAH-1, demostró que los productos de escisión IgG comparables a los generados por proteasas específicas conocidas son claramente niveles detectables por encima y mantenidos en donantes sanos normales o por una enfermedad autoinmune inflamatoria, la artritis reumatoide. Por el contrario, los pacientes con osteoartritis mostraron niveles que eran similares y en el intervalo de las muestras del individuo normal.

10 **EJEMPLO 8: ENSAYO IGG MODIFICADO DE ESCISIÓN DE CADENA ÚNICA**

Un ensayo en fase sólida, ELISA, usando el reactivo RAH-1 para la detección de sclgG en suero se describe en el Ejemplo 4. Con el fin de optimizar el rango de detección para muestras de concentraciones séricas sclgG, se hicieron cambios específicos.

15 Las placas utilizadas eran placas Immulon 4 HBX (VWR) recubiertas de anticuerpos policlonales de conejo (RAH-1) a una concentración de 5 tg/ml en PBS pH 7,2 (100 µL por pocillo) mediante el sellado y la incubación de la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lava 3 veces con PBS, 0,05% de Tween (Sigma) en un lavador de placas automático. Todas las muestras y los estándares son diluidos con PBS que contenía 20 1%BSA, 0,05% Tween. Fc-biotina Anti IgG (USBiologicals, Swampscott, MA) es el medio de detección de estándares sclgG o incógnitas de sclgG en diluciones de suero.

La placa se bloquea usando 200 µL de SuperBlock (Pierce) durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) con agitación y después se lavó la placa 3 veces con PBS, 0,05% de Tween en un lavador de placas automático.

25 El material estándar; producto de digestión de proteasa Mab1, se añade a los pocillos por duplicado a partir de 600 ng/mL (100 µL por pocillo, 3 diluciones). Las muestras de suero se diluyen 1:100, 1:200, 1:400, etc., como sea apropiado). Las muestras se añaden por duplicado al mismo tiempo y se incubaron durante una hora a RT en un agitador, seguido de lavado 3 veces con PBS, 0,05% de Tween en un lavador de placas automático.

30 La dilución de biotina IgG Fc de 1:20.000 (diluidos apropiadamente en tampón de ensayo), se añade a todos los pocillos (100 µL por pocillo y se incubó durante una hora a RT en un agitador, seguido de lavado 3 veces con PBS, 0,05% de Tween en un lavador de placas automático.

35 SA-HRP (estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante, Sigma, utilizada a una dilución de 1:30.000 en PBS, 0,05% de Tween, 1% BSA) se añade a todos los pocillos (100 µL por pocillo y se incubó durante una hora a RT en un agitador seguido de lavado 3 veces con PBS, 0,05% de Tween en un lavador de placas automático.

40 Finalmente, 100 µL de TMB (un sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) proporcionado por el fabricante (Sigma) se añade a cada pocillo y se dejó incubar durante aproximadamente 10 minutos para el desarrollo de color. La reacción se detuvo con 75 µL de 1 N H₂S₀₄ y leer la placa a 450 nm.

45 Utilizando el formato anterior de ELISA, el ensayo demostró en gran medida la mejora de linealidad y recuperaciones de pico de sclgG en el suero normal, sano. Se determinó la linealidad de dilución del ensayo en dos grupos de suero, diluido 1:100 y después se insertó Mab1 a concentraciones de 150 ng/ml y 300 ng/ml, y aún más diluyeron a concentraciones de 0, 25, 75, y 100% de suero. Cada dilución de la muestra se ensayó por triplicado y la media se calcularon las recuperaciones de analitos. La linealidad se evaluó mediante el cálculo de un coeficiente de correlación R² a partir de una trama del (eje y) observado frente a los resultados de recuperación de analito esperados del (eje x) para cada conjunto de muestras. Los valores de R² eran: Ejemplo 1 Bajo 0,9983; La muestra 1 de alta 0,9913; Muestra 2 Bajo 0,9852; Muestra 2 Alta 0,973; y la linealidad de dilución era 100% para todas las diluciones.

50 **EJEMPLO 9: DETECCIÓN DE IgG ESCINDIDA DE CADENA ÚNICA EN SUERO**

55 El suero de los pacientes con AR se utiliza exclusivamente con el fin de estudiar más a fondo los resultados en el ejemplo 4, donde algunas muestras de suero de este grupo de pacientes tenía sclgG notablemente mayor en comparación con los controles.

60 Las muestras de suero de 10 sujetos con artritis reumatoide (RA) y de 10 individuos sanos de edad y sexo emparejados se obtuvieron a partir de Genómica de Colaboración. Usando el ensayo modificado descrito en el Ejemplo 8, se analizaron las muestras y los resultados mostrados en la Fig. 10. Los resultados indicaron que 4 de los 10 sujetos con RA demostraron concentraciones séricas de sclgG >60µg/mL. En el grupo de control sano, las concentraciones variaron de sclgG <8.2µg/mL a 52,7 µg/mL. Las muestras para esta comparación no fueron seleccionadas rigurosamente para la etapa de la enfermedad, regímenes de tratamiento, etc. Por lo tanto, se puede prever que una mayor discriminación de sclgG de suero sano y enfermedad relacionada podría ocurrir en los análisis 65 longitudinales de pacientes de ensayos clínicos bien controlados y diseñados de forma prospectiva. Sin embargo,

los presentes ensayos sobre estas muestras comerciales sugieren que las concentraciones elevadas scIgG pueden detectarse en pacientes con enfermedad.

5 EJEMPLO 10: PREPARACIÓN DE ANTICUERPO MONOCLONAL DE IgG DE ANTI BISAGRA

Sería deseable producir una molécula definida, tal como un anticuerpo monoclonal para la fabricación y uso potencial en pacientes humanos que una IgG escindida y IgG no intacta. El siguiente procedimiento representa un método para la generación de tal molécula.

Un análogo péptido 12-mer de la IgG1 humana de bisagra inferior y dominio de CH2 contiguo era el inmunógeno: TCPPCPAPELLG (residuos 7-18 de la SEQ ID NO: 1). Las cisteínas naturales fueron reemplazadas por alaninas para dar la variante TAPPAPAPELLG. Se añadió una cisteína N-terminal para permitir la conjugación a la hemocianina de lapa californiana (KLH) por métodos químicos estándar para reacción a sulfhidrilos libres. El inmunógeno final era KLH-CTAPPAPAPELLG.

Conejos blancos de Nueva Zelanda (3) se inmunizaron con el péptido KLH de 0,5 mg en adyuvante completo de Freund, usando múltiples sitios subcutáneos (5). Los animales fueron reforzados con 0,25 mg de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund a intervalos de tres semanas para un total de 4 inmunizaciones adicionales.

Los títulos de anticuerpos de suero a una versión conjugada BSA del mismo péptido se controlaron durante el transcurso de la inmunización por métodos de ELISA estándar. Animales (2) fueron elegidos para la esplenectomía sobre la base de los datos de título. Hibridomas de conejo se generaron a partir de linfocitos de bazo derivadas fusionados con células compañeras de fusión de conejo (Speiker-Polet, 1995 PNAS EE.UU. 92: 9348-9352). El crecimiento celular se examinó 2 a 3 semanas después de la fusión en placas múltiples.

Los hibridomas positivos se rastrearon mediante ELISA sobre placas revestidas con el péptido conjugado BSA-inmunógeno. Se identificaron clones positivos múltiples a partir de cada fusión. La selección adicional implicó la unión a IgG1 intacta y varios fragmentos F(ab')₂ generados enzimáticamente de IgG1. A partir de estas tácticas de cribado y contracribado, 3 clones fueron seleccionados con base en una fuerte selectividad de unión al péptido inmunógeno y fragmentos de F(ab')₂ con extremos en o cerca del terminal del péptido inmunógeno y con una unión mínima a IgG1 intacta. los hibridomas positivos se subclonaron y se expandieron.

IgG de conejo se purificó a partir de sobrenadantes de células individuales por métodos estándar, incluyendo cromatografía en proteína A inmovilizada. La especificidad de las IgGs de conejo purificadas por la unión a análogos de péptidos de la bisagra IgG1 humana, así como IgG intacta y fragmentos de IgG F(ab')₂ purificadas creadas usando mAbs individuales o doble escindidas utilizando IdeS y enzimas de MMP-3 fueron probadas en protocolos estándar de ELISA. En pocas palabras, los péptidos que fueron sintetizados por la química de péptidos estándar y eran biotinilados N-terminalmente se capturaron en pocillos recubiertos con estreptavidina. La IgG y los fragmentos se recubrieron directamente en 10 µg/mL. La unión de mAbs de conejo se detectó por peroxidasa de Fc de rábano picante de IgG anti-conejo de cabra bien caracterizada y sistemas de sustrato OPD.

Resultados de ELISA para mAb conejo 91-2 se muestran en la Fig. 11. Hubo una clara selectividad de unión para los péptidos de bisagra inferiores que terminan en residuos 16-22 de la SEQ ID NO: 1 (L-L-G-G-P-S-V-F). Hay poca o ninguna unión a los residuos aguas arriba correspondientes a dichos segmentos de la bisagra superior, la bisagra central o principios de bisagra inferior abarcada por 3-16 de la SEQ ID NO: 1 (D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L). Hubo una unión insignificante al fragmento F(ab')₂ generado por MMP-3 y el fragmento scIgG (de acuerdo con la falta de unión a los análogos peptídicos del sitio de escisión de MMP-3 en entre los residuos 14 y 15 de la SEQ ID NO: 1 (P-A-P*E-L-L). En contraste, no hubo una unión sustancial al fragmento F(ab')₂ generado por Ides y scIgG. Por lo tanto, especificidad de unión de mAb de conejo conformada así al inmunógeno al que se obtuvo. IgG Rb (conejo) directamente recubierta era un control positivo.

Ensayo del complemento.

Células WIL2-S, una línea celular B de linfoblastoide que expresa CD20 (ATCC), se utilizaron como células diana para ensayos de CDC. 50µl de las células se añadieron a los pocillos de placas de 96 pocillos para una concentración final de 8×10^4 células por pocillo en RPMI, FBS inactivada por calor al 5%, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio, penicilina (500 U/ml), estreptomomicina (500 U/ml), 2 mM de L-glutamina. Un 50µl adicional se añadió a los pocillos con o sin anticuerpos de varias concentraciones y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas. 50µl de 10% complemento de conejo (Invitrogen) se añadió a los pocillos y las placas se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Las placas se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos y 50 µL de sobrenadante se retiró a placas separadas y CDC se midió con el kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche). La absorbancia se midió usando un Spectra max Plus 384 (PerkinElmer). Los datos se normalizaron a la citotoxicidad máxima con Triton X-100 (Sigma Aldrich) y el control mínimo que contenía sólo las células y se complementan solo.

La Figura 12 muestra que las mAbs anti bisagra 3 de conejo fueron capaces de restaurar lisis celular dependiente de

complemento de las células diana cuando valoró en presencia de una concentración fija del fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo que une CD20. Las mAbs de conejo fueron más eficaces, y, a concentraciones más bajas que una preparación de mAb anti bisagra de conejo policlonal (un componente del mismo sistema de detección para scIgG de suero descrita anteriormente). El anticuerpo intacto a CD20 estaba activo, como se esperaba, pero su fragmento de F(ab')₂ y la versión de scIgG no era activa por separado. Las mAbs anti bisagra de conejo no eran capaces de dirigir la lisis celular en ausencia de fragmento de F(ab')₂ de unión celular. Estos resultados establecen que los anticuerpos monoclonales anti bisagra pueden reconstituir función efectora mediada por complemento a productos de escisión proteolítica de IgG1 que de otro modo serían inactivos.

10

LISTADO DE SECUENCIA
[0116]

15 <110> Centocor, Inc.
 <120> FRAGMENTOS DE CLIVAJE INMUNOGLOBULINA UTILIZADOS COMO INDICADORES DE ENFERMEDADES Y AGLUTINANTE DE FIJACIÓN
 20 <130> GEN5192PCT
 <140> PARA SER ASIGNADO
 25 <141> 2008-08-04
 <150> 60/955162
 <151> 2007-08-10
 <160> 11
 30 <170> Versión de la Patente 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 1

40 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 20 25

45 <210> 2
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

50 <400> 2

55 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 1 5 10 15
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25 30
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 35 40

60

65

ES 2 593 791 T3

5

<210> 3
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 3

15

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 1 5 10 15

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 20 25 30

20

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40

25

<210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 4

Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
 1 5 10 15

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

35

40

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

45

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 1 5 10

50

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

55

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 1 5 10

60

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

65

ES 2 593 791 T3

5

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10

10

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 8

20

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10

25

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

30

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
1 5 10

35

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1 5 10

45

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50

<400> 11

55

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
1 5 10

60

65

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una composición de anticuerpo que comprende al menos un anticuerpo que se une específicamente a un producto de escisión de la proteasa IgG **caracterizado por**, a) tener un peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacta en condiciones no desnaturalizantes y b) que es separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno de 135 kDa y un fragmento que contiene CH2 bajo desnaturalización pero no condiciones reductoras y c) en el que el reactivo no reacciona con IgG intacta,
- 10
- y en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un sitio de escisión específica de la proteasa en IgG humana producida por IdeS, TCPPCPAPELLG.
- 15
2. La composición de anticuerpo de la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo es:
- i) un antisuero policlonal; o
- ii) al menos un anticuerpo monoclonal.
- 20
3. Un análogo de péptido de sitio IgG de escisión de la proteasa humana que consiste en TCPPCPAPELLG unido covalentemente a hemocianina de lapa californiana a través del terminal N.
4. Un método de preparación de la composición de anticuerpo de la reivindicación 1, usando un animal no humano inmunizado con el péptido análogo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el reactivo se purificó a partir del suero de dicho animal por preabsorción sobre una matriz de afinidad de IgG humana.
- 25
5. Un método de detección de un proceso de la enfermedad en un sujeto mediante el análisis de una muestra de tejido del sujeto, en el que dicho método comprende la detección por la composición de anticuerpo de la reivindicación 1 de una IgG proteolíticamente escindida por IdeS **caracterizada por** a) tener un peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacta en condiciones fisiológicas y b) que es separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno de 135 kDa y un fragmento que contiene CH2 bajo desnaturalización pero no las condiciones de reducción.
- 30
6. El método de la reivindicación 5, en el que la enfermedad se selecciona de una enfermedad artrítica, una enfermedad maligna, una enfermedad infecciosa, y una enfermedad vascular, tal como que la enfermedad es la artritis reumatoide, por ejemplo en donde la enfermedad es la artritis reumatoide y la muestra es el líquido sinovial.
- 35
7. El método de la reivindicación 5, en el que la muestra es sangre o un producto de fraccionamiento de la misma.
- 40
8. El método de la reivindicación 5, en el que la detección se realiza en muestras de tejido que no sea una fracción de sangre.
- 45
9. El método de la reivindicación 5, en el que el procedimiento de detección se selecciona del grupo que consiste en ELISA, tinción inmunohistoquímica y transferencia de Western.
- 50
10. Un kit que incluye un reactivo para la detección de un marcador de enfermedad en el tejido de un sujeto, cuyo reactivo comprende al menos un anticuerpo que se une específicamente a una IgG escindida, cuyo anticuerpo es capaz de detectar un producto de escisión de IgG caracterizada por a) tener peso molecular que es comparable a una IgG de mamífero intacta en condiciones no desnaturalizantes y b) que es separable en dos fragmentos que comprenden un fragmento de unión a antígeno de 135 kDa y un fragmento que contiene CH2 bajo condiciones desnaturalizantes pero condiciones no reductoras y c) en el que el reactivo no reacciona con IgG intacta,
- 55
- y en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un sitio de escisión específica de la proteasa en IgG humana producida por IdeS, TCPPCPAPELLG.
- 60
11. La composición de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en terapia.

Fig. 1

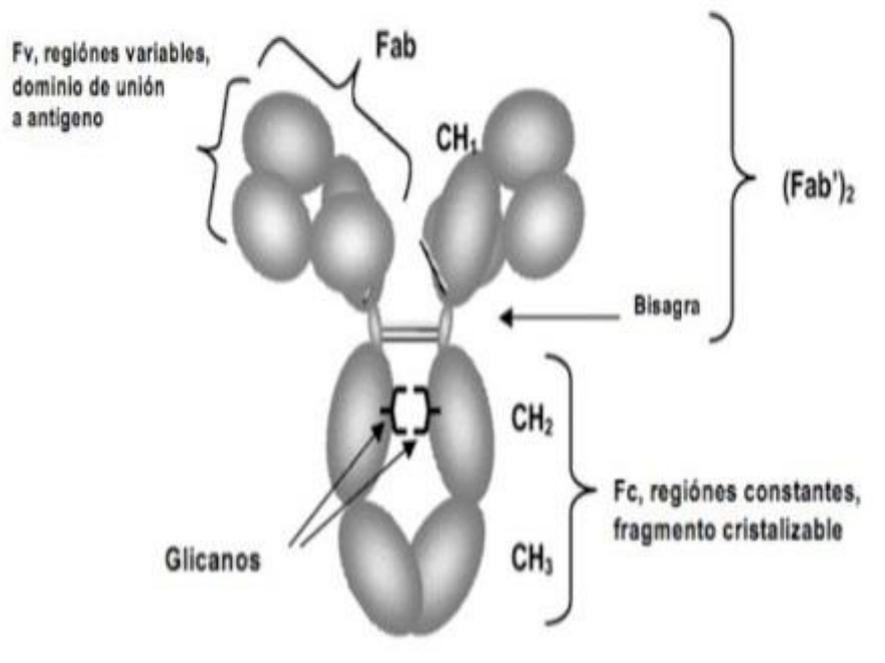


Fig. 2

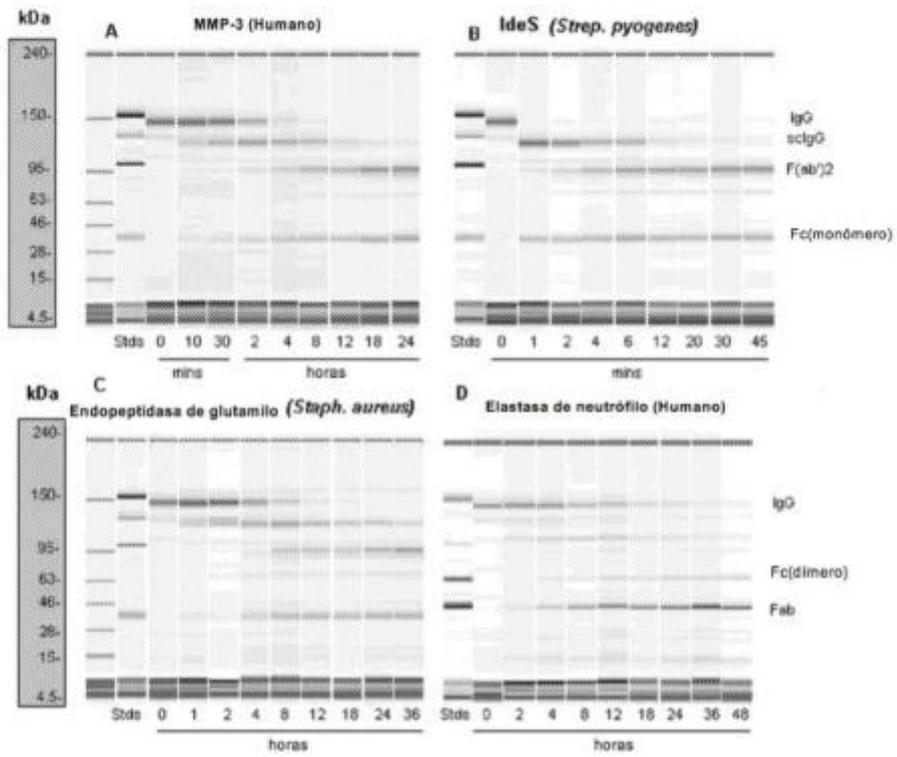


Fig. 3

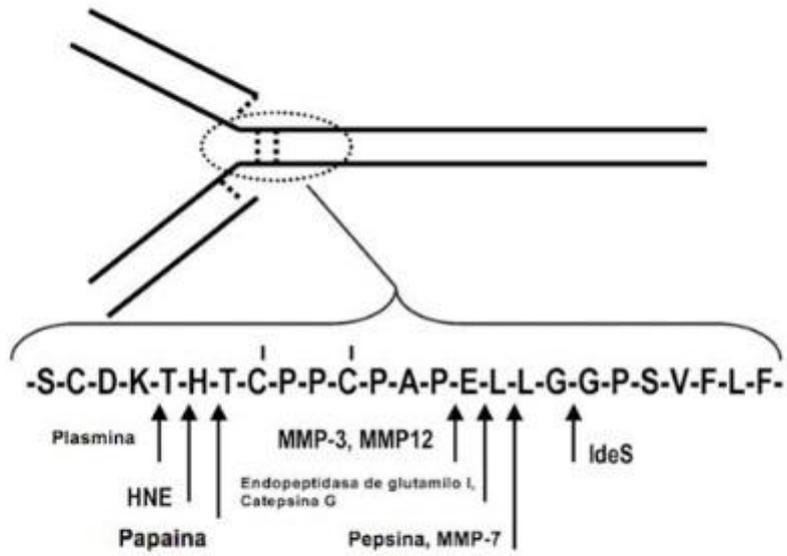


Fig. 4

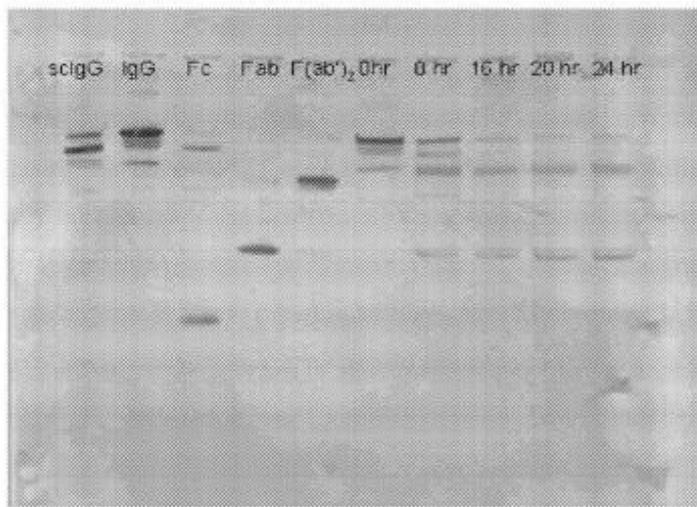


Fig. 5

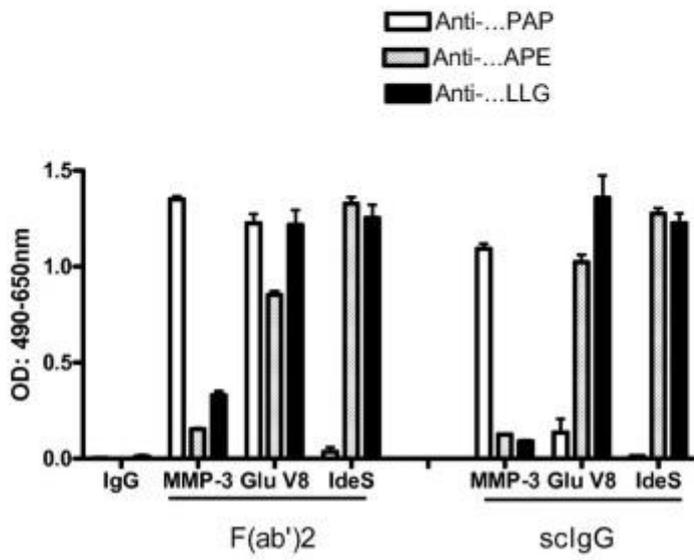


Fig. 6

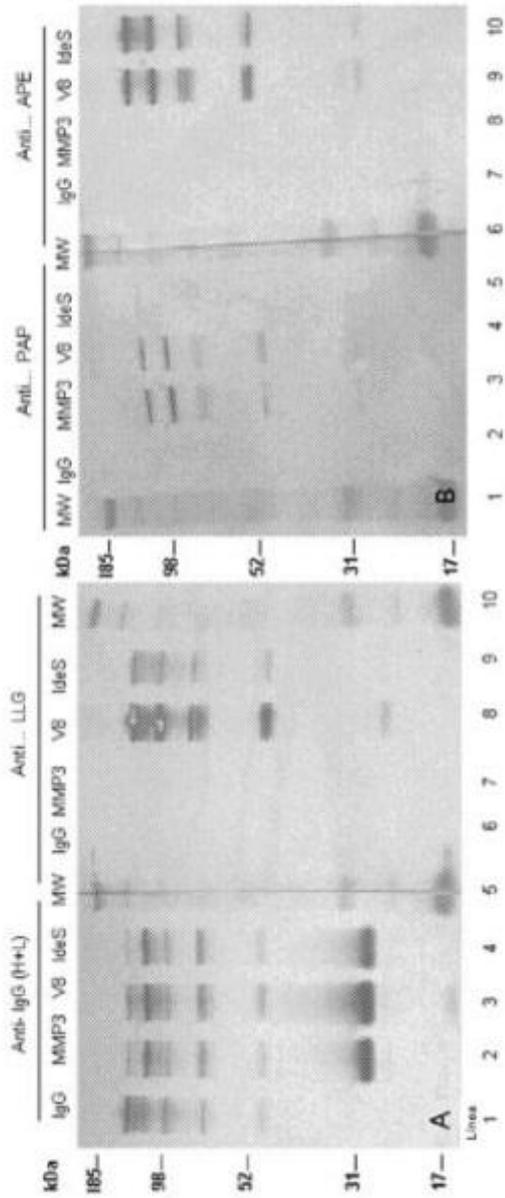


Fig. 7

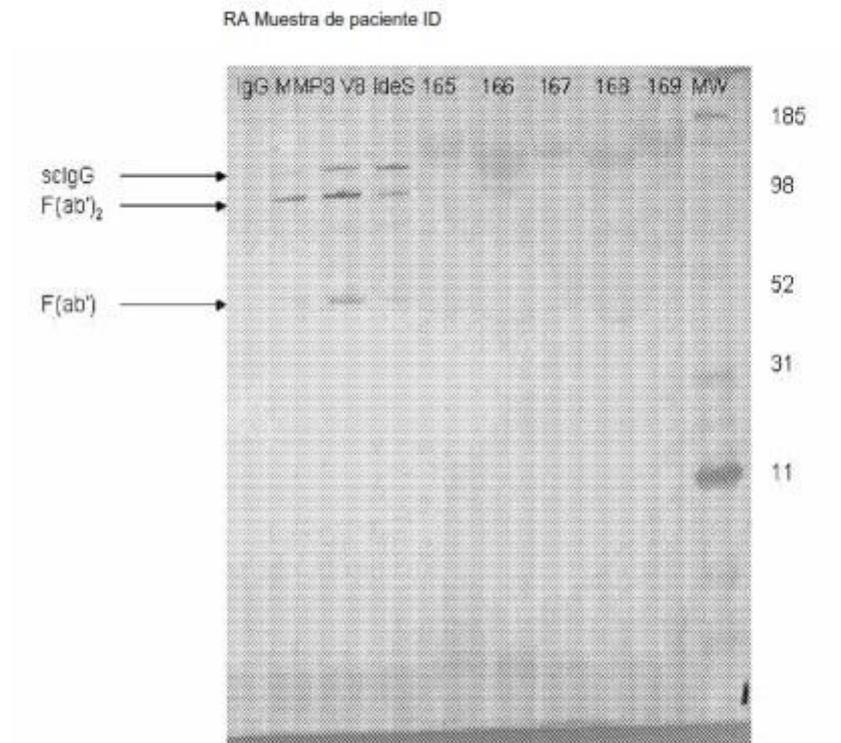


Fig. 8

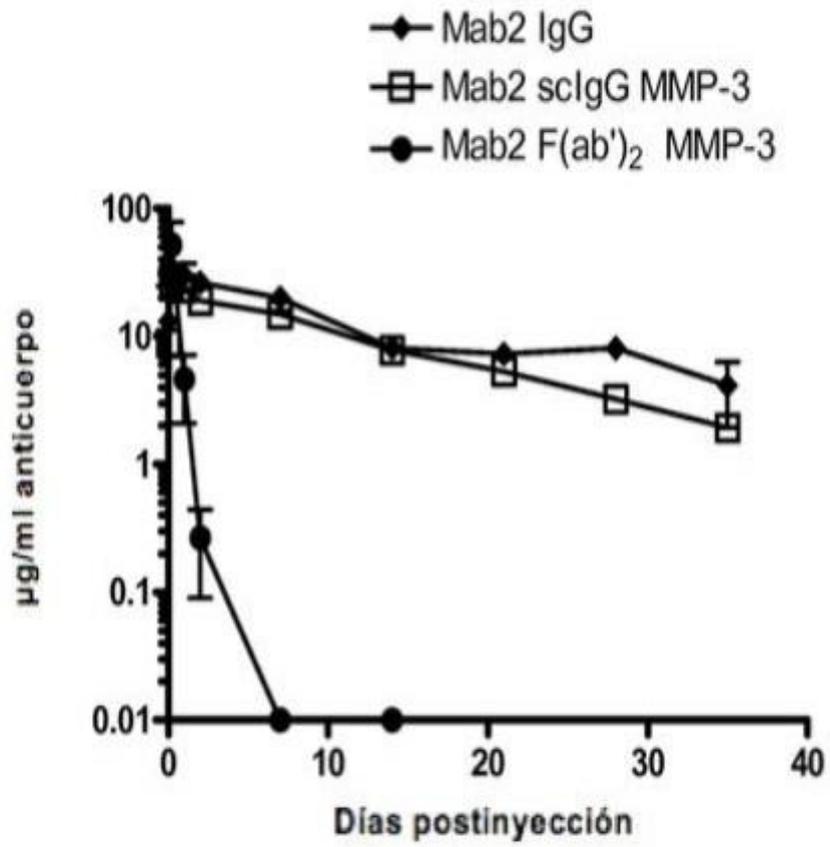


Fig. 9

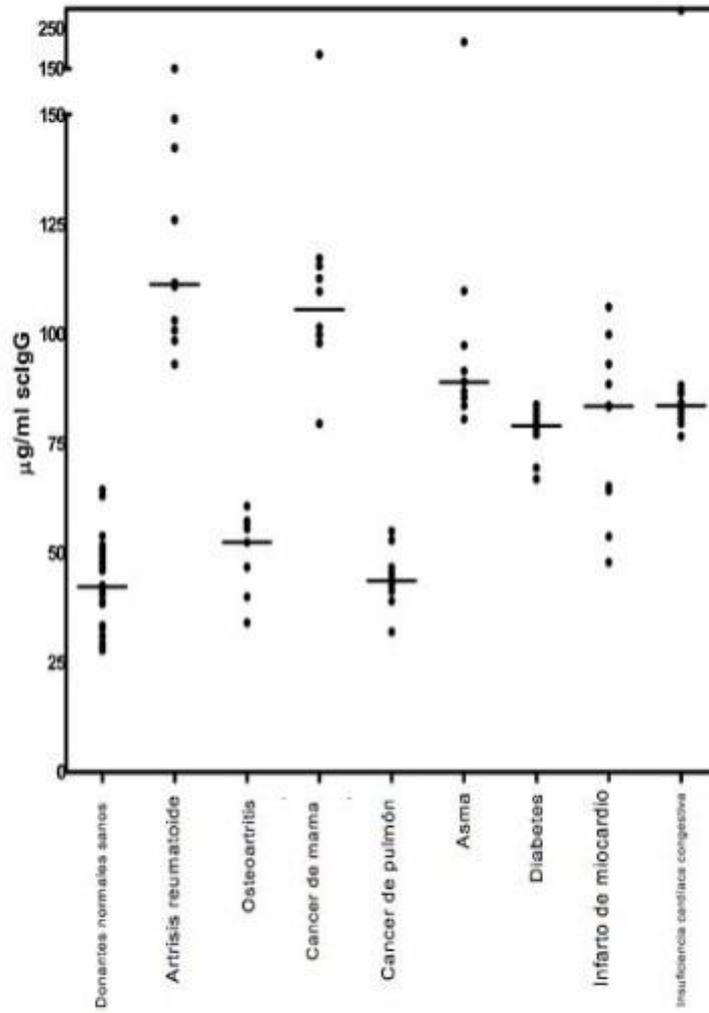


Fig. 10

Determinaciones ELISA de sclgG de suero

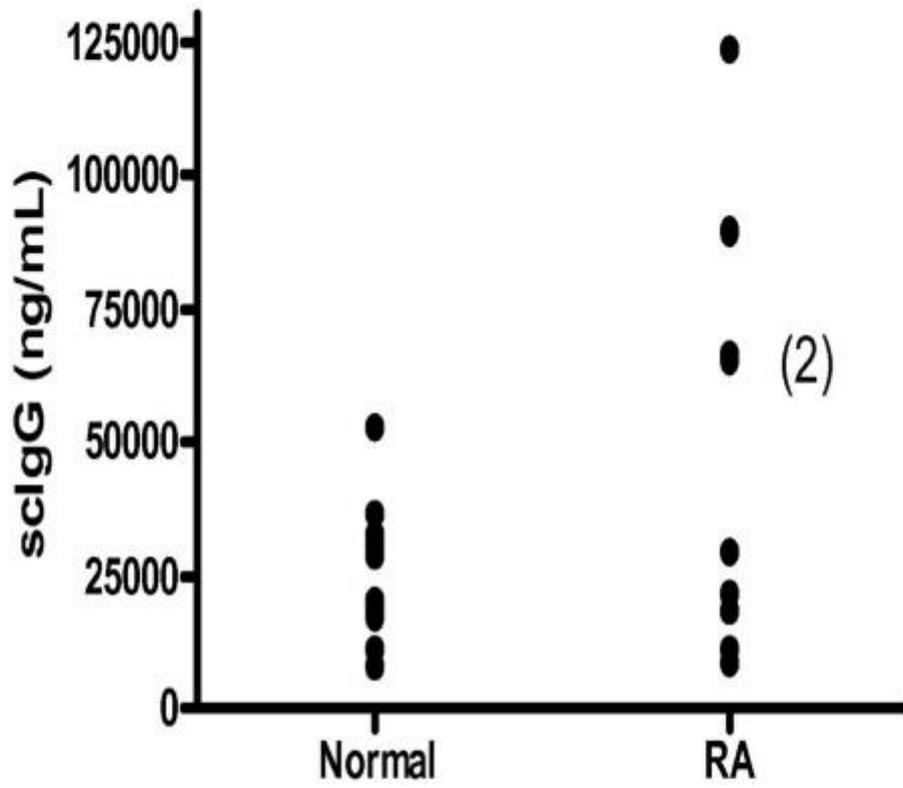


Fig. 11

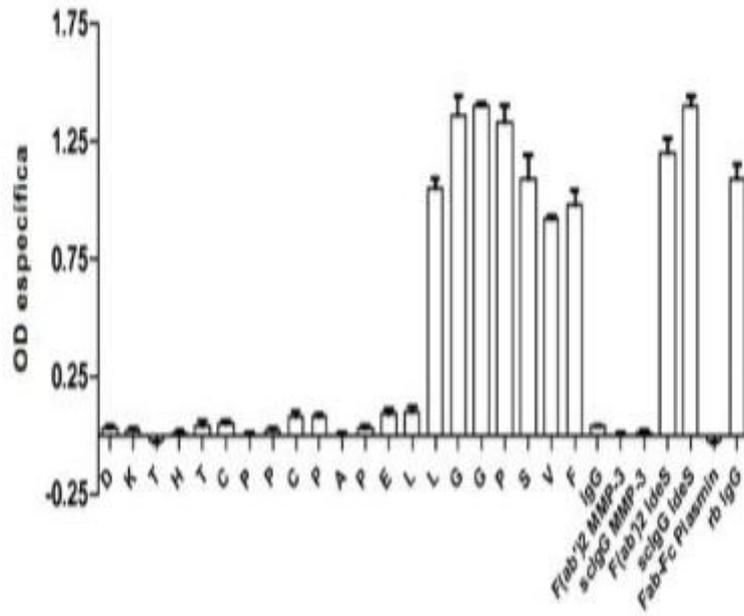


Fig. 12

