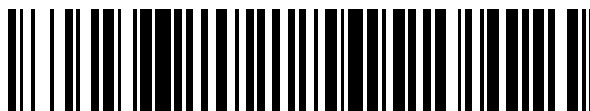


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 200**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2009 PCT/US2009/047024**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09152319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2009 E 09763608 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2347004**

54 Título: **Reactivos y métodos para detectar la proteína polimórfica haptoglobina**

30 Prioridad:

**13.06.2008 US 129250 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2017**

73 Titular/es:

**RAPPAPORT FAMILY INSTITUTE FOR  
RESEARCH IN THE MEDICAL SCIENCES  
(100.0%)  
Efron Street, P.O.Box 9697  
3109602 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**VICTOR, JACOB;  
BERKOWITZ, NOAH y  
LEVY, ANDREW P.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 602 200 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

Reactivos y métodos para detectar la proteína polimórfica haptoglobina

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que reaccionan de manera diferencial con variantes alélicas e isoformas de una proteína polimórfica, a un fragmento de unión a antígeno comprendido en la misma, a proteínas, a células, a partículas virales, a composiciones y a kits que comprenden a los mismos. La invención proporciona métodos para determinar el tipo de haptoglobina de un sujeto.

### Antecedentes de la invención

10 El locus genético de la haptoglobina en 16q22 es polimórfico con dos clases de alelos conocidas denominadas 1 y 2 (Langlois M et al, Clin Chem 42: 1589-1600, 1996). El polimorfismo es bastante común, siendo las frecuencias mundiales de los dos alelos aproximadamente iguales. La haptoglobina es un gen principal para la susceptibilidad al desarrollo de complicaciones vasculares diabéticas en múltiples estudios poblacionales longitudinales y transversales (Levy A et al, New Eng J Med 343: 969-70, 2000; Roguin A et al, Am J Cardiol 87: 330-2, 2001). Los individuos diabéticos homocigóticos para el alelo de haptoglobina 2 (Hp 2) tienen 5 veces más riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular en comparación con individuos diabéticos homocigóticos para el alelo de haptoglobina 1 (Hp 1), estando presente un riesgo intermedio en los heterocigotos (Levy A et al, J Am Coll Cardiol 40: 1984-90, 2002). El riesgo corresponde a la diabetes tanto de tipo 1 como de tipo 2 (Costecou, T. Ferrell, RE, Orchard T.J. Haptoglobin genotype: a determinant of cardiovascular complication risk in Type 1 diabetes. Diabetes 57:1702-1706 (2008)). Estudios mecanísticos que usaban los productos proteicos purificados de los alelos Hp 1 y Hp 2 han identificado profundas diferencias en la actividad antioxidante e inmunomoduladora (Frank M et al, Blood; 98: 3693-8, 2001; Asleh R et al, Circ Res 92: 1193-200, 2003).

15 Existen diferencias funcionales, así como estructurales entre los diversos productos proteicos alélicos de haptoglobina (Langlois M et al, Clin Chem 42: 1589-1600, 1996). El alelo Hp 2 tiene dos copias del exón 3 y 4 del alelo Hp1, lo que da como resultado la duplicación de un dominio de multimerización en el exón 3. Por consiguiente, el producto proteico del alelo Hp1 únicamente forma dímeros, los productos proteicos del alelo Hp2 se combinan para formar polímeros cíclicos que varían en su tamaño desde tres monómeros a más. En los heterocigotos, hay presentes polímeros lineales que contienen ambos productos proteicos alélicos.

20 El documento US 2006/0228753 describe métodos para detectar un fenotipo de una proteína polimórfica, tal como haptoglobina.

30 El desarrollo de una prueba de ELISA basada en anticuerpos para determinar el tipo de haptoglobina se ha visto impedido por la aparente falta de determinantes antigénicos únicos para cualquiera de los dos productos proteicos. Aparte de una única unión en el sitio de duplicación del exón tres, no existen diferencias en la secuencia primaria de aminoácidos entre los alelos de haptoglobina. Dada la necesidad de exploración de grandes poblaciones de individuos diabéticos (el 10% de la población occidental) respecto de su tipo de haptoglobina para determinar el tratamiento óptimo así como la necesidad de explorar rápidamente determinadas poblaciones (es decir, pacientes que padecen un infarto agudo de miocardio) existe una gran necesidad de una prueba sencilla, rápida y económica para fenotipar la haptoglobina.

### Compendio de la invención

40 La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de un anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) que comprende al menos una región variable de cadena ligera y al menos una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera: una CDRL 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y comprendiendo dicha región variable de cadena pesada: una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. El anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une con mayor afinidad a Hp 2-2 que a Hp 2-1, y con mayor afinidad a Hp 2-1 que a Hp 1-1. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas. En otra realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es el anticuerpo monoclonal denominado 4G12.

50 En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina es aquel producido por el hibridoma murino depositado en la ATCC con la denominación de depósito para patente PTA-9815. En otra realización, se proporciona una composición del anticuerpo anteriormente mencionado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otras realizaciones, los anticuerpos pueden ser humanizados o quiméricos. En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo scFv.

55 En otra realización, se proporcionan composiciones que comprenden una célula, una línea celular empaquetadora,

un anticuerpo, una proteína recombinante o una partícula vírica recombinante que comprende cualquier anticuerpo anti-haptoglobina descrito en la presente memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En la presente memoria se divulga una región determinante de la complementariedad de un anticuerpo anti-haptoglobina tal como se realiza en la presente memoria que se une con mayor afinidad a una primera isoforma de haptoglobina que a una segunda isoforma de haptoglobina. En una realización, la región determinante de la complementariedad se une con mayor afinidad a la isoforma de haptoglobina Hp 2-2 que a Hp 2-1. En otra realización, la región determinante de la complementariedad se une con mayor afinidad a la isoforma de haptoglobina Hp 2-1 que a Hp 1-1. En otra realización, la región determinante de la complementariedad se une con mayor afinidad a la isoforma de haptoglobina Hp 2-2 que a Hp 1-1. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una afinidad de unión en orden decreciente para las isoformas Hp 2-2; Hp 2-1; y Hp 1-1 de haptoglobina, en donde la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la región determinante de la complementariedad de cadena ligera (CDRL) 1, la CDRL2 y la CDRL3 del anticuerpo 4G12, o se produce por el hibridoma murino depositado en la ATCC con la denominación de depósito para patente PTA-9815; y la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la región determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDRH) 1, la CDRH2 y la CDRH3 de dicho anticuerpo 4G12 o se produce por el hibridoma murino depositado en la ATCC con la denominación de depósito para patente PTA-9815. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina que comprende al menos una región variable de cadena ligera y al menos una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera: una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y comprendiendo dicha región variable de cadena pesada: una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y que tiene una afinidad de unión en orden decreciente para las isoformas de haptoglobina Hp 2-2; Hp 2-1; y Hp 1-1.

En otra realización, el anticuerpo mencionado anteriormente comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo mencionado anteriormente comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7. Y en otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7.

En otra realización, cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados puede tener una región variable de cadena ligera o de cadena pesada que es al menos una de quimerizada, humanizada o de CDR injertada.

En otra realización, cualquiera de los anticuerpos anti-haptoglobina anteriormente mencionados pueden comprender además al menos un compuesto o polipéptido seleccionado entre un marcador o indicador detectable. A modo de ejemplo no limitante, el marcador detectable es una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

En otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) de la presente invención. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal denominado 4G12 o producido por el hibridoma murino depositado en la ATCC con la denominación de depósito para patente PTA-9815. En una realización adicional, se proporcionan células hospedadoras que producen los anticuerpos monoclonales anteriormente mencionados.

En una realización adicional, se proporcionan anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, se proporcionan anticuerpos que tienen una secuencia variable de cadena pesada codificada por una secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 6. En realizaciones adicionales, dicha secuencia de nucleótidos puede codificar cadenas ligeras y pesadas con uno o más aminoácidos sustituidos de manera conservativa.

En otra realización, se proporciona un método para determinar un fenotipo de haptoglobina de un sujeto que comprende

a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con un anticuerpo anti-haptoglobina realizado en la presente memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo, formando un complejo unido entre el anticuerpo o fragmento anti-haptoglobina y la haptoglobina en la muestra biológica;

b) determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicha haptoglobina y dicho anticuerpo o fragmento anti-haptoglobina; y

c) comparar dicha afinidad de unión determinada cuantitativamente con un valor obtenido a partir de una afinidad

de unión determinada cuantitativamente de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo a una isoforma Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 aislada, en donde la afinidad de unión determinada es indicativa del tipo de isoforma de Hp, determinando de este modo el tipo de fenotipo de Hp en dicho sujeto.

5 En otra realización, la muestra biológica es suero. En una realización adicional, la muestra biológica es plasma. En otras realizaciones, el plasma es plasma que se ha anticoagulado con citrato, heparina o EDTA.

10 En una realización adicional del método anterior, el complejo de anticuerpo anti-haptoglobina-antígeno puede inmovilizarse sobre un sustrato, tal como uniendo el anticuerpo anti-haptoglobina o el fragmento de unión a antígeno del mismo al sustrato. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-haptoglobina sobre el sustrato es un anticuerpo anti-haptoglobina policlonal y en otras realizaciones, puede ser un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina, tal como, pero sin limitación, cualquier anticuerpo anteriormente mencionado, incluyendo 4G12 o el anticuerpo producido por el hibridoma murino depositado en la ATCC con la denominación de depósito para patente PTA-9815.

15 En realizaciones adicionales, el método anterior puede comprender además poner en contacto dicho complejo inmovilizado con una cantidad adicional de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo; y determinar una afinidad de unión entre dicho antígeno y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo.

20 En realizaciones adicionales, dicho anticuerpo anti-haptoglobina adicional puede ser cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados o un fragmento de unión a antígeno de los mismos. En otras realizaciones, el anticuerpo adicional puede comprender además un marcador o indicador detectable; el marcador puede ser, a modo de ejemplo no limitante, una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. En otra realización, la etiqueta puede ser un fluoróforo.

25 Tal como se divulga en la presente memoria, el anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo puede proporcionarse a una dilución por debajo de la concentración en donde no se observa una afinidad de unión diferencial entre las diferentes isoformas de haptoglobina, tal como, pero sin limitación, una dilución de 10-1000 veces por debajo de la concentración en donde no se observa la afinidad de unión diferencial entre diferentes isoformas de haptoglobina. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas.

30 En otra realización, los métodos anteriormente mencionados proporcionan resultados en menos de aproximadamente tres horas. En otra realización, los resultados se proporcionan en menos de aproximadamente 1-2 horas. En otras realizaciones, los dispositivos de los centros asistenciales fácilmente utilizados en la consulta del médico o incluso de manera doméstica pueden proporcionar resultados en aproximadamente 10-20 minutos, o incluso menos.

35 En otra realización, se proporciona un método para ensayar la susceptibilidad de un sujeto a una complicación diabética, que comprende la etapa de determinar el fenotipo de haptoglobina del sujeto según cualquiera de los métodos anteriores, en donde la presencia del fenotipo Hp 2-2 indica una mayor susceptibilidad a una complicación diabética. En algunas realizaciones, la complicación diabética es una o más complicaciones vasculares, tal como, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca crónica, muerte cardiovascular, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, restenosis asociada a la angioplastia coronaria, retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética, menos vasos sanguíneos colaterales de la arteria coronaria e isquemia de miocardio.

40 En otra realización, se proporciona un método para probar el potencial de un sujeto diabético de beneficiarse de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir el riesgo o incidencia de la enfermedad vascular, que comprende la etapa de determinar el fenotipo de haptoglobina del sujeto según cualquiera de los métodos anteriores, en donde la presencia de Hp 2-2 indica un mayor beneficio de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir riesgo o incidencia de enfermedades vasculares. En otra realización, la enfermedad vascular es insuficiencia cardíaca crónica, muerte cardiovascular, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, restenosis asociada a la angioplastia coronaria, retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética, menos vasos sanguíneos colaterales de la arteria coronaria e isquemia de miocardio o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, la reducción del estrés oxidativo se logra mediante terapia antioxidante. En otra realización, la terapia antioxidante es la administración de vitamina E o un análogo, metabolito o derivado de la misma.

50 También se divulga un método para ensayar la utilidad de una proteína recombinante candidata a anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno de la misma en la distinción entre los alelos de haptoglobina de tipos Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2, que comprende las etapas de:

55 a) poner en contacto el candidato a anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma con una concentración conocida de la molécula de Hp 1-1, de la molécula Hp 2-1 y de la molécula Hp 2-2 aisladas, formando un complejo; y

b) determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicho candidato a anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma y dichas Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2; indicando una afinidad de unión

significativamente diferente a cada una de Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 que dicho candidato a anticuerpo o proteína recombinante es capaz de distinguir entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2.

5 En una realización adicional del método anterior, puede inmovilizarse el complejo de dicha Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 y dicho candidato a anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma sobre un sustrato. En otra realización, puede ponerse en contacto el complejo con una cantidad adicional de un anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma anti-haptoglobina posteriormente a dicha inmovilización; y después determinar una afinidad de unión entre dicha Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo o proteína recombinante. En una realización adicional, al menos un del candidato a anticuerpo o el anticuerpo adicional es el candidato a anticuerpo, el otro anticuerpo, en caso de estar presente, puede ser cualquiera de aquellos descritos en la presente memoria. En otras realizaciones, el anticuerpo adicional puede comprender además un marcador o indicador detectable; el marcador puede ser, a modo de ejemplo no limitante, una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. En otras realizaciones, el marcador es un fluoróforo. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas.

15 En una realización adicional, el candidato a anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma puede proporcionarse a una dilución por debajo de la concentración en donde no se observa afinidad de unión diferencial, tal como, pero sin limitación, a una dilución 10-1000 veces por debajo de la concentración en donde no se observa unión diferencial.

También se divulga un método para ensayar un anticuerpo o una proteína recombinante respecto de su utilidad para distinguir entre variantes alélicas de una proteína polimórfica, que comprende las etapas de:

20 a) poner en contacto el anticuerpo, proteína recombinante o un fragmento de unión a antígeno de la misma con una concentración conocida de variantes alélicas aisladas de una proteína polimórfica; y

b) determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma y dichas variantes alélicas; indicando una afinidad de unión significativamente diferente a cada una de las variantes alélicas que dicho anticuerpo o proteína recombinante es capaz de distinguir entre ellas.

25 En una realización adicional, el complejo de dichas variantes alélicas y dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma puede estar inmovilizado sobre un sustrato. En una realización adicional, puede ponerse en contacto el complejo con una cantidad adicional de dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma posteriormente a dicha inmovilización; seguido de determinar una afinidad de unión entre dichas variantes alélicas y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo o proteína recombinante. En otras realizaciones, el anticuerpo adicional puede comprender además un marcador o indicador detectable; el marcador puede ser, a modo de ejemplo no limitante, una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

35 En realizaciones adicionales del método anterior, se proporciona el anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma a una dilución por debajo de la concentración en donde no se observa afinidad de unión diferencial. En otra realización, la dilución es 10-1000 veces menor que la concentración en donde no se observa la afinidad de unión diferencial.

40 En otra realización, se proporciona un método para probar el potencial de un sujeto diabético de beneficiarse de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir la incidencia de la enfermedad cardiovascular, que comprende la etapa de determinar el fenotipo de haptoglobina del sujeto según cualquiera de los métodos anteriores, en donde la presencia de Hp 2-2 indica un mayor beneficio de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir la incidencia de complicaciones cardiovasculares. En otra realización, las complicaciones cardiovasculares incluyen insuficiencia cardíaca crónica, muerte cardiovascular, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, restenosis asociada a la angioplastia coronaria, retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética, menos vasos sanguíneos colaterales de la arteria coronaria e isquemia de miocardio. En otras realizaciones, la reducción del estrés oxidativo se logra mediante terapia antioxidante. En otra realización, la terapia antioxidante es la administración de vitamina E o un análogo, metabolito o derivado de la misma.

45 En otra realización, se proporciona un kit que comprende un anticuerpo monoclonal, un fragmento de unión o una proteína recombinante anti-haptoglobina tal como se describe en la presente memoria e instrucciones para el uso de dicho anticuerpo monoclonal para determinar el fenotipo de haptoglobina de un sujeto. En otra realización, el anticuerpo monoclonal, el fragmento de unión o la proteína recombinante anti-haptoglobina comprende un marcador o indicador detectable; el marcador puede ser, a modo de ejemplo no limitante, una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. En otra realización, el marcador es un fluoróforo. En una realización adicional, el kit incluye instrucciones que indican que los resultados de la prueba son útiles para determinar el potencial del sujeto para beneficiarse de la reducción del estrés oxidativo o de una terapia antioxidante para las complicaciones vasculares, en donde la presencia de Hp 2-2 indica un mayor beneficio de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir la incidencia de complicaciones cardiovasculares.

También se divulgan métodos para identificar anticuerpos que detectan de manera diferencial variantes alélicas de una proteína polimórfica siguiendo las etapas de: 1) obtener una diversidad de anticuerpos monoclonales después de la inmunización de un animal con la variante alélica de la proteína polimórfica que es diferente de aquella variante alélica que se detecta deseablemente de manera diferencial; 2) explorar la diversidad de anticuerpos monoclonales para detectar diferencialmente una variante alélica deseada, en condiciones en donde sea detectable la reactividad diferencial y 3) identificar anticuerpos monoclonales que detectan de manera diferencial la variante alélica deseada. En una realización, la exploración comprende unir un anticuerpo policlonal anti-proteína polimórfica a un sustrato en una diversidad de ubicaciones separadas, incubar la diversidad de ubicaciones separadas con muestras de las variantes alélicas de la proteína polimórfica, posteriormente incubar la diversidad de ubicaciones con el anticuerpo monoclonal y después, detectar la unión del anticuerpo en la diversidad de ubicaciones. En una realización, el anticuerpo policlonal anti-proteína polimórfica se une a todas las variantes alélicas. En una realización, el anticuerpo monoclonal está marcado de manera detectable. En otra realización, el anticuerpo monoclonal no está marcado y se usa un compañero de unión para el anticuerpo monoclonal que está marcado de manera detectable para detectar el anticuerpo monoclonal unido. En otra realización, las condiciones comprenden la dilución adicional del anticuerpo monoclonal por debajo de la concentración en donde no se produce la detección diferencial de las variantes alélicas de la proteína polimórfica. En otra realización, la concentración es 10-1000 veces menor. En otra realización, la detección diferencial se identifica mediante variaciones en la unión del anticuerpo monoclonal a diluciones mayores, tales como, pero sin limitación, 2.000-10.000. En otra realización, se identifica la detección diferencial de determinadas variantes alélicas utilizando una muestra a una mayor concentración que aquella en donde no se produce la detección diferencial de las variantes alélicas de la proteína recombinante. En otra realización, las variantes alélicas son humanas. En otra realización, la proteína polimórfica es haptoglobina. En otra realización, los anticuerpos detectan de manera diferencial Hp 2-2 en comparación con Hp 2-1 y detectan diferencialmente Hp 2-1 en comparación con Hp 1-1. En otra realización, se detecta de manera más deseable Hp 2-2 que Hp 2-1 y en otra realización, se detecta de manera más deseable Hp 2-1 que Hp 1-1. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas.

Un anticuerpo identificado tal como se realiza en la presente memoria puede ser útil en un inmunoensayo cuando se emplea como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección. En otra realización, el anticuerpo de detección está marcado de manera detectable. En otra realización, se cuantifica la unión del anticuerpo de detección usando un compañero de unión para el anticuerpo de detección que está marcado de manera detectable.

También se divulga un método para ensayar la utilidad de un anticuerpo o de una proteína recombinante en la distinción entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2, que comprende (a) inmovilizar un anticuerpo anti-haptoglobina sobre un sustrato para formar un complejo anticuerpo-sustrato; (b) poner en contacto una primera cantidad del complejo de anticuerpo-sustrato con una molécula de Hp 1-1; (c) poner en contacto una segunda cantidad del complejo de anticuerpo-sustrato con una molécula de Hp 2-1; (d) poner en contacto una tercera cantidad del complejo de anticuerpo-sustrato con una molécula de Hp 2-2; (e) poner en contacto los productos de las etapas (b), (c) y (d) con el anticuerpo o proteína recombinante de ensayo; y (e) determinar cuantitativamente una unión o interacción entre el anticuerpo o proteína recombinante de ensayo y Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2; indicando un valor obtenido de la determinación cuantitativa que es característico de la presencia de cada una de Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 que el anticuerpo de ensayo distingue entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2. En otra realización, las isoformas de haptoglobina son humanas.

### Descripción detallada de la presente invención

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-haptoglobina (Hp) que se unen con mayor afinidad a Hp 2-2 que a Hp 2-1 y con mayor afinidad a Hp 2-1 que a Hp 1-1. En una realización, Hp 2-2 se refiere a polímeros de haptoglobina que comprenden Hp 2 pero no Hp 1. En una realización, Hp 2-1 se refiere a polímeros de haptoglobina que comprenden tanto Hp 1 como Hp 2. En una realización, Hp 1-1 se refiere a polímeros de haptoglobina que comprenden Hp 1 pero no Hp 2. En determinadas realizaciones, las isoformas de haptoglobina son humanas.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere, en una realización, a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos salvo por posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales pueden ser altamente específicos, dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que pueden sintetizarse por células hospedadoras en un cultivo de hibridoma, sin contaminarse con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso según la presente invención pueden producirse mediante el método de hibridoma, descrito originariamente por Kohler et al, *Natura* 256: 495 (1975), o puede producirse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también incluyen clones de fragmentos de anticuerpo de reconocimiento de antígeno y contenedores del sitio de unión (clones de Fv) aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597

(1991). En otra realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales denominados 4G12.

Los anticuerpos monoclonales pueden formarse en cualquier especie animal. En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina es aquel producido por el hibridoma murino depositado en la ATCC con la denominación de depósito para patente PTA-9815. En otra realización, se proporciona una composición del anticuerpo anteriormente mencionado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La proteína polimórfica puede ser una proteína humana o puede ser de un animal, tal como un animal domesticado o ganado, en el que la detección de isoformas particulares de la proteína polimérica es diagnósticamente, pronósticamente o terapéuticamente útil. Dichos animales domesticados incluyen perros, gatos, hámsteres, hurones, conejos y roedores, incluyendo ratas y ratones. Los animales de ganado incluyen, por ejemplo, vacas, ovejas y búfalos. No se pretende que estos animales sean limitantes, por ejemplo, también se incluyen animales de zoológico. En el caso de que la proteína polimórfica sea haptoglobina, la haptoglobina puede ser humana.

En una realización, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. Estos términos son bien entendidos por los expertos en la materia y se refieren a una proteína glucosilada (que comprende restos de azúcar) que consiste en uno o más polipéptidos que se unen específicamente a un antígeno. Una forma de anticuerpo constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de anticuerpo, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada son conjuntamente responsables de la unión a un antígeno y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse además en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 25 kDa o de aproximadamente 214 aminoácidos) comprenden una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos en el extremo NH<sub>2</sub> y una región constante kappa o lambda en el extremo COOH. De manera similar, las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos) comprenden una región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos) y una de las regiones constantes de cadena pesada anteriormente mencionadas, por ejemplo, gamma (de aproximadamente 330 aminoácidos). Se conocen bien las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

En otra realización, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos o inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpo que mantienen unión específica a un antígeno, incluyendo, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fv, scFv y Fd, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios y proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno de un anticuerpo y una proteína que no sea un anticuerpo. Los anticuerpos pueden marcarse de manera detectable, por ejemplo, un radioisótopo, una enzima que genera un producto detectable, una proteína fluorescente u otro resto fluorescente (fluoróforo) y similares. Los anticuerpos pueden conjugarse además a otros restos, tales como miembros de pares de unión específicos, por ejemplo, biotina (miembro del par de unión específico de biotina-avidina), una toxina, por ejemplo, toxoide tetánico, y similares. Los anticuerpos pueden unirse también a un soporte sólido, incluyendo, pero sin limitación, placas o perlas de poliestireno y similares. El término también abarca fragmentos Fab', Fv, F(ab')<sub>2</sub> y/u otros fragmentos de anticuerpo que retengan unión específica a antígeno y anticuerpos monoclonales. Todo esto se conoce bien en la técnica.

En otra realización, los anticuerpos pueden existir en una diversidad de otras formas incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos híbridos bifuncionales (es decir, biespecíficos) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) y Bird et al., Science, 242, 423-426 (1988)). (Véase, en general, Hood et al., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2<sup>a</sup> ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)).

En otra realización, los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de región variable y constante que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, pueden unirse los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Un ejemplo de un anticuerpo terapéutico quimérico es una proteína híbrida compuesta de el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efecto de un anticuerpo humano (por ejemplo, el anticuerpo quimérico anti-Tac producido por las células del n.º de registro de la A.T.C.C. CRL 9688), aunque pueden usarse otras especies de mamífero.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos marco conservados de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados

también pueden contener restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservadas importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno y típicamente dos dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana.

En una realización, la expresión "región marco conservada" o "FR" son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable. Las regiones marco conservadas se han definido de manera precisa. Véase, por ejemplo, Kabat, E. A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, National Institutes of Health, EE.UU. (5ª ed. 1991). Cada dominio variable tiene típicamente cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. En algunas realizaciones, "FR" se refiere también a una región variable de anticuerpo que comprende restos de aminoácidos colindantes o próximos a, pero fuera de las regiones CDR, es decir, regiones que interactúan directamente con el antígeno, actuando como elemento de reconocimiento de la molécula de anticuerpo dentro de la región variable de un anticuerpo. En una realización, la expresión "región marco conservada" pretende significar cada dominio de la región marco conservada que está separado por las CDR. En algunas realizaciones, las secuencias de las regiones marco conservadas de cadenas ligeras o pesadas diferentes están relativamente conservadas entre especies. Las regiones marco conservadas de cadena pesada y ligera combinadas de un anticuerpo sirven para posicionar y alinear las CDR para su unión adecuada al antígeno.

En una realización, el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" se refiere a restos de aminoácidos que comprenden sitios de combinación con antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En otras realizaciones, la "CDR" se define además usando el esquema de numeración mejorado de Chothia y la definición de "CDR de contacto" descrita en la presente memoria. En otras realizaciones, el término "CDR" comprenderá regiones como las descritas por Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y en Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest.* (1991), y en Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y en MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996). Los aminoácidos de las CDR de los dominios variables se definieron inicialmente por Kabat, basándose en la variabilidad de secuencia, como consistentes en los restos de aminoácido 31-35B (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada humana (VH) y en los restos de aminoácido 24-34 (CDRL2), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera humana (VL), usando el sistema de numeración de Kabat para los restos de aminoácido de un anticuerpo. Véase Kabat et al., *sequences of proteins of immunological interest*, US Dept. Health and Human Services, NIH, EE.UU. (5ª ed. 1991). Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) presentaron otra definición de las CDR basándose en los restos incluidos en los bucles estructurales tridimensionales de las regiones de dominio variable, que se observó que eran importantes en la actividad de unión a antígeno. Chothia et al. definieron las CDR como consistentes en los restos de aminoácido 26-32 (CDRH1), 52-56 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada humana (VH), y en los restos de aminoácido 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera humana (VL). Combinando las definiciones de CDR de Kabat y Chothia, las CDR consisten en los restos de aminoácido 26-35B (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en VH humana y en los restos de aminoácido 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en VL humana, basándose en el sistema de numeración de Kabat.

En otras realizaciones, se proporcionan una o más sustituciones conservativas de aminoácidos en una o más de las seis regiones CDR en un anticuerpo.

En otra realización, la expresión "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón o conejo) que contiene uno o más aminoácidos (en una región marco conservada, una región constante o una CDR, por ejemplo) que se han sustituido con un aminoácido situado de manera correspondiente procedente de un anticuerpo humano. En general, los anticuerpos humanizados producen una respuesta inmunitaria reducida en un hospedador humano, en comparación con una versión no humanizada del mismo anticuerpo. En otras realizaciones, puede proporcionarse el injerto de CDR, en donde los seis bucles de CDR que comprenden el sitio de unión a antígeno se injertan en las regiones marco conservadas humanas correspondientes, un procedimiento bien conocido en la técnica.

En otras realizaciones, se entiende que las proteínas recombinantes o anticuerpos diseñados y producidos mediante los presentes métodos pueden tener sustituciones conservativas de aminoácidos adicionales que no tienen un efecto sustancial en la unión a antígeno u otras funciones del anticuerpo. Por sustituciones conservativas se entienden combinaciones tales como aquellas de los siguientes grupos: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

En otra realización, el término "unión específica" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse preferencialmente a un analito particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes analitos. En determinadas realizaciones, una interacción de unión específica discriminará entre analitos deseables y no deseables en una muestra, en algunas realizaciones, más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 o 10.000 veces).



En determinadas realizaciones, la afinidad entre un agente de captura y un analito cuando se unen específicamente en un complejo de agente de captura/analito se caracteriza por una  $K_D$  (constante de disociación) de menos de  $10^{-6}$  M, menos de  $10^{-7}$  M, menos de  $10^{-8}$  M, menos de  $10^{-9}$  M, menos de  $10^{-9}$  M, menos de  $10^{-11}$  M o menos de aproximadamente  $10^{-12}$  M o menor.

5 En otra realización, la "región variable" de una cadena pesada o ligera de anticuerpo es un dominio maduro N-terminal de las cadenas. Todos los dominios, CDR y numeración de restos se asignan basándose en alineamientos de secuencia y en el conocimiento estructural. La identificación y numeración de restos marco conservados y CDR es tal como se describe por Chothia y otros (Chothia Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol* 1998;278:457-79).

10 En otras realizaciones, VH es el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo. VL es el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, que puede ser del isotipo kappa (K) o lambda. Los anticuerpos K-1 tienen el isotipo kappa-1 mientras que los anticuerpos K-2 tienen el isotipo kappa-2 y VL es la cadena ligera variable lambda.

En una realización, los términos "determinar", "medir", "evaluar" y "ensayar" se usan de manera indistinta e incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

15 En otra realización, los términos "polipéptido" y "proteína", usados de manera indistinta en la presente memoria, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados o derivados química o bioquímicamente y polipéptidos que tienen armazones peptídicos modificados. El término incluye proteínas de fusión incluyendo, pero sin limitación, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin restos de metionina N-terminales; proteínas marcadas inmunológicamente; proteínas de fusión con compañeros de unión detectables, por ejemplo, proteínas de fusión que incluyen como compañero de unión una proteína fluorescente, beta galactosidasa, luciferasa, etc.; y similares. El término también puede incluir los anticuerpos monoclonales proporcionados en la presente memoria. Los polipéptidos pueden ser de cualquier tamaño y el término "péptido" se refiere a polipéptidos que tienen una longitud de 8-50 restos (por ejemplo, de 8-20).

20 En otra realización, el término "aislado", cuando se usa en el contexto de un anticuerpo aislado, se refiere a un anticuerpo de interés que está al menos un 60% libre, al menos un 75% libre, al menos un 90% libre, al menos un 95% libre, al menos un 98% e incluso al menos un 99% libre de otros componentes con los que se asocia el anticuerpo antes de su purificación.

30 En otra realización, la molécula de anticuerpo producida mediante los métodos proporcionados en la presente memoria incluye cualquier molécula, en tanto que esta comprenda la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos incluyen un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprenda una región Fc y similares. Un anticuerpo es una proteína que se produce en un cuerpo vivo mediante una reacción inmunitaria como resultado de la estimulación con antígeno exógeno y tiene la actividad de unirse específicamente a un antígeno correspondiente. Los ejemplos de anticuerpo incluyen un anticuerpo secretado por una célula de hibridoma preparada a partir de un esplenocito de un animal inmunizado con un antígeno; un anticuerpo preparado mediante una técnica de recombinación genética, a saber, un anticuerpo obtenido mediante la introducción de un vector de expresión de anticuerpo con un gen de anticuerpo insertado en una célula hospedadora; y similares. Los ejemplos específicos incluyen un anticuerpo producido por un hibridoma, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano y similares.

40 La "región variable" de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula y por lo tanto determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La región variable se denomina de este modo debido a que es la más distinta en secuencia respecto de otros anticuerpos dentro del mismo isotipo. La mayor parte de la variabilidad de secuencia ocurre en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Existe un total de 6 CDR, tres de cada una por cadena pesada y ligera, denominadas VH CDR1 (o CDRH1), VH CDR2 (o CDRH2),  
45 VH CDR3 (o CDRH3), VL CDR1 (o CDRL1), VL CDR2 (o CDRL2) y VL CDR3 (o CDRL3). La región variable fuera de las CDR se refiere como la región marco conservada (FR). Aunque no es tan diversa como las CDR, aparece variabilidad de secuencia en la región FR entre diferentes anticuerpos. En general, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un soporte estable (la región FR) sobre el que puede explorarse una diversidad de unión a antígeno sustancial (las CDR) por el sistema inmunitario para obtener especificidad frente a una amplia serie  
50 de antígenos.

Los anticuerpos o moléculas modificadas proporcionadas en la presente memoria pueden ser no humanas, quiméricas, humanizadas o totalmente humanas. Los anticuerpos quiméricos comprenden la región variable de un anticuerpo no humano, por ejemplo, los dominios VH y VL de origen de ratón o rata, unidos operablemente a la región constante de un anticuerpo humano. En otra realización, un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende una región marco conservada (FR) humana y una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (normalmente de ratón o de rata). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el armazón se denomina "aceptora". En otra realización, las moléculas modificadas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender una región variable humanizada.

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria que detectan de manera diferencial a Hp 2-2 frente a Hp 2-1 y a Hp 2-1 frente a 1-1 se identificaron inmunizando a ratones con Hp 1-1 purificada por afinidad, seguido de la exploración de sobrenadantes a partir de cultivos iniciales respecto de la unión diferencial a Hp 2-2. En determinados experimentos, se presentaron las variantes de haptoglobina al anticuerpo monoclonal después de su unión a un anticuerpo policlonal anti-Hp unido a una superficie plástica (pocillo de placa de microtitulación). Se observó que entre un gran número de anticuerpos monoclonales, no se observaba una detección diferencial de las variantes de haptoglobina usando un anticuerpo monoclonal relativamente más concentrado. Sin embargo, tras la dilución adicional del anticuerpo monoclonal de "detección", se observó detección diferencial de Hp 2-2 en algunos sobrenadantes. Dichos anticuerpos monoclonales diferencialmente reactivos, después de su purificación y conjugación con un marcador detectable, pudieron usarse como anticuerpos tanto de captura como de detección para identificar de manera diferencial a Hp 2-2 en muestras. En determinadas realizaciones, la dilución del anticuerpo monoclonal purificado como anticuerpo de detección a más de 1:2000 y en otras realizaciones a más de 1:5000 y a más de 1:10000 proporciona detección diferencial de variantes alélicas de haptoglobina.

En otras realizaciones, se usa una dilución de 10-10.000 por debajo del título en donde no existe detección diferencial de las diferentes isoformas de Hp. En otras realizaciones, la dilución es de 1.000-5.000.

En otra realización, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) que comprende al menos una región variable de cadena ligera y al menos una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera: una CDRL 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y comprendiendo dicha región variable de cadena pesada: una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en donde dicho anticuerpo monoclonal tiene una afinidad de unión en orden decreciente para las isoformas de haptoglobina Hp 2-2; Hp 2-1; y Hp 1-1. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o proteína recombinante que comprende el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-Hp de la invención. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o proteína recombinante que comprende las CDR de un anticuerpo anti-Hp de la invención. En una realización, el anticuerpo puede ser monoclonal. En otra realización, el anticuerpo puede ser humanizado o quimérico. En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo scFv.

La presente invención abarca variantes de anticuerpos de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Una variante de anticuerpo se refiere, en una realización, a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un aminoácido parental. Preferentemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. Dichas variantes tienen necesariamente menos de un 100% de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo parental. En una realización, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad o similitud de secuencia de al menos el 75% respecto de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 77% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 80% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 83% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 85% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 87% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 90% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 92% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 95% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo o variante tendrá una identidad o similitud de secuencia de aproximadamente el 97% respecto del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo parental. La identidad o similitud respecto de esta secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) respecto de los restos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Debe entenderse que ninguna de las extensiones, eliminaciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable afecta a la identidad o similitud de secuencia. En general, la variante de anticuerpo es una que tiene una región hipervariable más larga (en uno o más restos de aminoácidos; por ejemplo, en aproximadamente uno a aproximadamente 30 restos de aminoácidos y preferentemente en aproximadamente dos a aproximadamente diez restos de aminoácidos) que la región hipervariable correspondiente de un anticuerpo parental.

Una "alteración de aminoácidos" se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Las alteraciones ejemplares incluyen inserciones, sustituciones y eliminaciones.

Una "inserción de aminoácidos" se refiere a la introducción de uno o más restos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos predeterminada. La inserción de aminoácidos puede comprender una "inserción peptídica" en cuyo caso se introduce un péptido que comprende dos o más restos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos en la secuencia de aminoácidos predeterminada. En caso de que la inserción de aminoácidos implique la inserción de un péptido, el péptido insertado puede generarse mediante mutagénesis aleatoria, de tal forma que tenga una secuencia de aminoácidos que no exista en la naturaleza.

El resto o los restos insertados pueden ser "restos de aminoácidos de origen natural" (es decir, codificados por el código genético) y seleccionados del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val).

La inserción de uno o más restos de aminoácidos de origen no natural también está abarcada por la definición de una inserción de aminoácidos en la presente memoria. Un "resto de aminoácido de origen no natural" se refiere a un resto, distinto de aquellos de los restos de aminoácidos de origen natural listados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente a restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los ejemplos de restos de aminoácidos de origen no natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de restos de aminoácidos, tales como aquellos descritos en Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991). Para generar dichos restos de aminoácidos de origen natural, pueden usarse los métodos de Noren et al. *Science* 244:182 (1989) y de Eliman et al., anteriormente citado. En resumen, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un resto de aminoácido de origen no natural seguido de la transcripción y traducción *in vitro* del ARN.

Una inserción de aminoácidos "en una región hipervariable" se refiere a la introducción de uno o más restos de aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos de una región hipervariable.

Una inserción de aminoácidos "adyacente a una región hipervariable" se refiere a la introducción de uno o más restos de aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal de una región hipervariable, de tal forma que al menos uno de los restos de aminoácido insertados forme un enlace peptídico con el resto de aminoácido N-terminal o C-terminal de la región hipervariable en cuestión.

Una "sustitución de aminoácido" se refiere al reemplazo de un resto de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada con otro resto de aminoácido diferente.

Debe entenderse que cualquier péptido de la presente invención, en una realización, puede aislarse, generarse sintéticamente, obtenerse mediante traducción de secuencias sometidas a cualquier técnica de mutagénesis así como obtenerse mediante cualquier técnica de evolución de proteínas, conocidas por los expertos en la materia.

En otra realización, la producción de proteínas recombinantes es un medio mediante el cual se producen los péptidos de la invención. Por lo tanto, las proteínas recombinantes pueden introducirse, en algunas realizaciones, en un organismo.

La "afinidad de unión" de un anticuerpo puede determinarse mediante métodos en equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinéticos. Los métodos para evaluar la afinidad de unión del anticuerpo se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ravindranath M et al, *J Immunol Methods* 169: 257-72, 1994; Schots A et al, *J Immunol Methods* 109: 225, 1988; y Steward M et al, *Immunology* 72: 99-103, 1991; y Garcia-Ojeda P et al, *Infect Immun* 72: 3451-60, 2004.

En otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquier anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquier fragmento de unión a antígeno de la presente invención.

En una realización de la presente invención, "ácido nucleico" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de fosfato con base de azúcar. El término incluye, en una realización, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). "Nucleótido" se refiere, en una realización, a una unidad monomérica de un polímero de ácido nucleico. El ARN puede estar en forma de un ARNt (ARN transferente), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, ARN pequeño inhibidor (ARNpi), microARN (miARN) o ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNpi y miARN (Caudy A A et al, *Genes & Devel* 16:2491-96 (2002), Paddison P J et al., *Methods Mol Biol.* 265:85-100 (2004), Paddison P J et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1443-8 (2002) y las referencias citadas en los mismos). El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN vírico, ADN lineal o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden ser de hebra simple, doble, triple o cuádruple. El término también incluye, en una realización, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de estructuras, pero las mismas bases. Los ejemplos de ácidos nucleicos artificiales son APN (ácidos peptidonucleicos), fosforotioatos y otras variantes del armazón de fosfato de los ácidos nucleicos nativos. El APN puede contener armazones peptídicos y bases nucleotídicas y puede ser capaz de unirse a moléculas tanto de ADN como de ARN. Los expertos en la materia conocen el uso de ácidos nucleico de fosforotioato y de APN y se describen, por ejemplo, en Nielsen P E, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57 (1999), Nielsen P E., *Mol Biotechnol.* 26:233-48 (2004), Rebuffat A G et al., *FASEB J.* 16:1426-8 (2002), Inui T et al., *J. Biol. Chem.*

272:8109-12 (1997), Chasty R et al., Leuk Res. 20:391-5 (1996) y las referencias citadas en los mismos; y Raz N K et al Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84. En otra realización, el término incluye cualquier derivado de cualquier tipo de ARN o ADN conocido en la técnica. Los expertos en la materia conocen la producción y el uso de ácidos nucleicos y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, Sambrook y Russell, eds. (2001), y en Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques (2001) Berger y Kimmel, eds.

Los ácidos nucleicos pueden producirse mediante cualquier proceso sintético o recombinante conocido en la técnica. Los ácidos nucleicos pueden modificarse además para alterar las propiedades biofísicas o biológicas mediante técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, el ácido nucleico puede modificarse para aumentar su estabilidad frente a las nucleasas (por ejemplo, "taponamiento terminal") o para modificar su lipofilia, solubilidad o afinidad de unión a secuencias complementarias.

El ADN según la invención también puede sintetizarse químicamente mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el ADN puede sintetizarse químicamente a partir de los cuatro nucleótidos en su totalidad o en parte mediante métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen aquellos descritos en Caruthers M H, Science 230:281-5 (1985). El ADN también puede sintetizarse preparando oligonucleótidos bicatenarios solapantes, rellenando los huecos y ligando juntos los extremos (véase, en general, Molecular Cloning (anteriormente citado) y Glover R P et al., Rapid Commun Mass Spectrom 9:897-901, 1995). Puede prepararse ADN que expresa homólogos funcionales de la proteína a partir de ADN de tipo silvestre mediante mutagénesis de sitio dirigido (véase, por ejemplo, Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends. A. M. Griffin y H. G. Griffin, Eds. (1995); y Kim D F et al, Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 66:119-26 (2001). El ADN obtenido puede amplificarse mediante métodos conocidos en la técnica. Un método adecuado es el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) descrito en Molecular Cloning (anteriormente citado).

Se divulgan en la técnica métodos para modificar ácidos nucleicos para lograr fines específicos, por ejemplo, en Molecular Cloning (anteriormente citado). Además, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden incluir una o más porciones de secuencia de nucleótidos que no son codificantes para la proteína de interés. Las variaciones en las secuencias de ADN, que están causadas por mutaciones puntuales o mediante modificaciones inducidas (incluyendo inserción, eliminación y sustitución) para potenciar la actividad, semivida o producción de los polipéptidos codificados por las mismas, también están abarcadas por la invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula o línea celular empaquetadora que comprende cualquier anticuerpo, péptido o ácido nucleico de la presente invención. En una realización, "vector" se refiere a un vehículo que facilita la expresión de una molécula de ácido nucleico insertada en el mismo en una célula. En otra realización, un vector puede facilitar la expresión en un sistema de expresión, tal como un extracto de reticulocitos. En una realización, un vector puede comprender un ácido nucleico que comprende secuencias de ácido nucleico no codificantes o secuencias codificantes distintas del ácido nucleico insertado.

Se conoce en la técnica un gran número de vectores que pueden usarse en esta realización. Un vector puede incluir, en algunas realizaciones, un marcador de selección adecuado. En otras realizaciones, el vector puede incluir además un origen de replicación o puede ser un vector lanzadera que puede propagarse en bacterias, tales como, por ejemplo, E. coli (en donde el vector comprende un marcador de selección adecuado y un origen de replicación) o ser compatible para su propagación en células de vertebrado o para su integración en el genoma de un organismo seleccionado. El vector según este aspecto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus modificado o no modificado, un cromosoma artificial o cualquier otro vector conocido en la técnica. Muchos de estos vectores están disponibles comercialmente y se conoce bien su uso por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Molecular Cloning. (2001), Sambrook y Russell, eds.).

En otra realización, la molécula de nucleótido presente en el vector puede ser un plásmido, cósmido o similares o un vector o hebra de ácido nucleico. En otra realización, la molécula de nucleótido puede ser material genético de un organismo vivo, un virus, un fago o material derivado de un organismo vivo, un virus o un fago. La molécula de nucleótido puede ser, en una realización, lineal, circular o concatemerizada y puede ser de cualquier longitud.

De acuerdo con otra realización, los vectores de ácido nucleico que comprenden la secuencia de ácido nucleico aislada incluyen un promotor para regular la expresión del ácido nucleico aislado. Se sabe que dichos promotores son elementos de secuencia de acción en cis necesarios para la transcripción, ya que sirven para unir la ARN polimerasa dependiente de ADN, que transcribe secuencias presentes cadena abajo de la misma.

En una realización, el ácido nucleico aislado puede subclonarse en el vector. "Subclonación", en todas las aplicaciones divulgadas en la presente memoria, se refiere, en una realización, a la inserción de un oligonucleótido en una molécula de nucleótido. Por ejemplo, en una realización, puede insertarse ADN aislado que codifica un transcrito de ARN en un vector de expresión adecuado que es adecuado para la célula hospedadora de tal forma que se transcribe el ADN para producir el ARN.

Puede lograrse la inserción en un vector, en una realización, ligando el fragmento de ADN en un vector que tiene extremos cohesivos complementarios. Sin embargo, si no están presentes los sitios de restricción complementarios

usados para fragmentar el ADN en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden, en una realización, modificarse enzimáticamente. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótido (enlazadores) en los extremos del ADN; estos enlazadores ligados pueden comprender oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. Los métodos de subclonación son conocidos para los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning* (2001), Sambrook y Russell, eds.

"Línea celular empaquetadora" se refiere, en una realización, a una célula que comprende la totalidad o una parte de un genoma vírico y que es capaz de producir partículas víricas. En una realización, la línea celular empaquetadora requiere del suministro exógeno de secuencias víricas adicionales (por ejemplo, en un vector, plásmido o similares) para producir partículas víricas. En otra realización, la línea celular empaquetadora no requiere de secuencias víricas adicionales para producir partículas víricas. La construcción y uso de líneas celulares empaquetadoras se conoce bien en la técnica y se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 6.589.763 y en Kalpana G V et al, *Semin Liver Disease* 19:27-37 (1999).

En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar el tipo de haptoglobina de un sujeto que comprende (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un anticuerpo anti-haptoglobina; y (b) determinar de manera cuantitativa una unión o interacción entre la proteína de haptoglobina y el anticuerpo en condiciones mediante las cuales un valor obtenido a partir de la determinación cuantitativa sea característico de una presencia de Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 en la muestra biológica. Por ejemplo, Hp 1-1, 2-1 y 2-2 producen valores característicos en un ensayo de ELISA sándwich utilizando el anticuerpo 4G12 de la presente invención.

En otra realización, la muestra biológica es suero. En una realización adicional, la muestra biológica es plasma. En otras realizaciones, el plasma es plasma que se ha anticoagulado con citrato, heparina o EDTA.

El anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) utilizado en el método se une con mayor afinidad a Hp 2-2 que a Hp 2-1 y con mayor afinidad a Hp 2-1 que a Hp 1-1. En otra realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales denominados 4G12. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 4G12 ha sido depositado en la ATCC con la designación de depósito para patente PTA-9815.

En una realización, el método de la presente invención puede proporcionar un valor característico de la presencia de Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 frente a un intervalo de concentraciones de haptoglobina de entre aproximadamente 0,15 gramos por litro y aproximadamente 2,5 gramos por litro. En otra realización, el método de la presente invención distingue entre Hp 1-1, 2-1 y 2-2 frente al intervalo fisiológico de concentración de haptoglobina. En otra realización, el método de la presente invención distingue entre Hp 1-1, 2-1 y 2-2 únicamente frente a un intervalo más restringido de concentración de haptoglobina. En una realización, la capacidad del método de la presente invención para distinguir entre Hp 1-1, 2-1 y 2-2 no se ve afectada por la hemólisis. En otra realización, la capacidad del método de la presente invención para distinguir entre Hp 1-1, 2-1 y 2-2 no se ve afectada por la hemólisis.

También se divulgan métodos para identificar anticuerpos que detectan de manera diferencial variantes alélicas de una proteína polimórfica siguiendo las etapas de: 1) obtener una diversidad de anticuerpos monoclonales inmunizando a un animal con la variante alélica de la proteína polimórfica que es diferente de aquella variante alélica que se detecta deseablemente de manera diferencial; 2) explorar la diversidad de anticuerpos monoclonales para detectar diferencialmente una variante alélica deseada, en condiciones en donde sea detectable la reactividad diferencial y 3) identificar anticuerpos monoclonales que detectan de manera diferencial la variante alélica deseada.

En una realización, la exploración comprende unir un anticuerpo policlonal anti-proteína polimórfica a un sustrato en una diversidad de ubicaciones separadas, incubar la diversidad de ubicaciones separadas con muestras de las variantes alélicas de la proteína polimórfica, posteriormente incubar la diversidad de ubicaciones con el anticuerpo monoclonal y después, detectar la unión del anticuerpo en la diversidad de ubicaciones. En una realización, el anticuerpo policlonal anti-proteína polimórfica se une a todas las variantes alélicas. En una realización, el anticuerpo monoclonal está marcado de manera detectable. En otra realización, el anticuerpo monoclonal no está marcado y se usa un compañero de unión para el anticuerpo monoclonal que está marcado de manera detectable para detectar el anticuerpo monoclonal unido. En otra realización, las condiciones comprenden la dilución adicional del anticuerpo monoclonal como anticuerpo de detección por debajo de la concentración en la que no se produce la detección diferencial de las variantes alélicas de la proteína polimórfica. En otra realización, la concentración es 10 veces menor. En otras realizaciones, la concentración es 100 veces menor. En algunas realizaciones, la dilución del anticuerpo monoclonal purificado es de 1:2000 y en otras realizaciones, de 1:5000 y de 1:10000 o incluso más diluido. Tal como se observa en los ejemplos a continuación, el uso de sobrenadantes de cultivos de anticuerpo monoclonal no mostró diferenciación en la detectabilidad de la haptoglobina, pero tras diluirse a 1:2000 o más, la diferencia en la unión a las variaciones alélicas de haptoglobina fue evidente, siendo la mayor diferenciación a una dilución 1:4000. Por lo tanto, la utilidad de los anticuerpos monoclonales para la detección diferencial no es evidente a concentraciones mayores de anticuerpo, tales como el uso de sobrenadantes y la dilución adicional proporciona condiciones en las que se produce la diferenciación.

Por lo tanto, en otra realización, la detección diferencial se identifica mediante variaciones en la unión del anticuerpo monoclonal a diluciones mayores. En otra realización, la proteína polimórfica es haptoglobina. En otra realización, los anticuerpos detectan de manera diferencial Hp 2-2 en comparación con Hp 2-1 y detectan diferencialmente Hp 2-

1 en comparación con Hp 1-1. En otra realización, se detecta de manera más deseable Hp 2-2 que Hp 2-1 y en otra realización, se detecta de manera más deseable Hp 2-1 que Hp 1-1.

5 En otra realización, se usa la concentración de la muestra, por ejemplo, la dilución de suero del paciente, para proporcionar diferenciación entre variantes alélicas. Tal como se apreciará en los ejemplos, el efecto de gancho de la pérdida de señal con el aumento de la concentración del analito utilizando los reactivos descritos en la presente memoria se observó de manera más prominente con Hp 2-1 que con Hp 2-2. Por lo tanto, el empleo de una muestra en un inmunoensayo en cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria a una concentración mayor proporciona una forma de diferenciar entre Hp 2-2 y Hp 2-1. Por lo tanto, en otra realización, se identifica la detección diferencial de determinadas variantes alélicas utilizando una muestra a una mayor concentración que aquella en donde no se produce la detección diferencial de las variantes alélicas de la proteína recombinante.

10 En otra realización, un anticuerpo identificado tal como se realiza en la presente memoria es útil en un inmunoensayo cuando se emplea como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección. En otra realización, el anticuerpo de detección está marcado de manera detectable, por ejemplo, mediante conjugación directa de un cromóforo, fluoróforo o enzima que pueda detectarse fácilmente. En otras realizaciones, el marcador es un radionúclido, un marcador quimioluminiscente u oro coloidal. En una realización, la enzima es peroxidasa de rábano picante. En otra realización, el marcador es oro coloidal. Estos y otros métodos de detección similares se conocen bien en la técnica. En otra realización, se cuantifica la unión del anticuerpo de detección usando un compañero de unión para el anticuerpo de detección que está marcado de manera detectable. En esta realización, el anticuerpo de detección no está marcado. En una realización, el compañero de unión para el anticuerpo monoclonal de ratón marcado de manera detectable es la IgG de cabra anti-conejo marcada con peroxidasa de rábano picante.

15 En otras realizaciones, los marcadores detectables adecuados incluyen enzimas, fluoróforos (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Texas red (TR), rodamina, sales de la serie de los lantánidos libres o queladas, especialmente de Eu.sup.3(+), solo por nombrar algunos fluoróforos), cromóforos, radioisótopos, agentes quelantes, colorantes, oro coloidal, partículas de látex, ligandos (por ejemplo, biotina) y agentes quimioluminiscentes. En una realización, las tiras reactivas rápidas de los centros asistenciales utilizan oro coloidal como marcador detectable de visibilidad. En caso de usar un marcador radiactivo, tal como los isótopos .sup.3 H, .sup.14 C, .sup.32 P, .sup.35 S, .sup.36 Cl, .sup.51 Cr, .sup.57 Co, 58Co, .sup.59 Fe, .sup.90 Y, .sup.125 I, .sup.131 I y .sup.186 Re, pueden utilizarse los procedimientos de conteo disponibles en la actualidad. En las realizaciones en donde el marcador es una enzima, la detección puede lograrse mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluorofotométricas, amperométricas o gasmétricas conocidas en la técnica.

20 Los marcadores directos son un ejemplo de marcadores que puedan usarse según la presente invención. Un marcador directo se ha definido como una entidad que, en su estado natural, es fácilmente visible, bien a simple vista o con la ayuda de la aplicación de un filtro óptico y/o de estimulación, por ejemplo, luz ultravioleta para promover la fluorescencia. Entre los ejemplos de marcadores coloreados que pueden usarse según la presente invención, se incluyen las partículas de soles metálicos, por ejemplo, partículas de sol de oro, tales como aquellas descritas por Leuvering (Patente de Estados Unidos n.º 4.313.734); las partículas de sol de colorante, tales como las descritas por Gribnau et al. (Patente de Estados Unidos n.º 4.373.932) y May et al. (documento WO 88/08534); látex coloreado, tal como las descritas por May, anteriormente citado, Snyder (documentos EP-A 0 280 559 y 0 281 327); o colorantes encapsulados en liposomas, tal como se describe por Campbell et al. (Patente de Estados Unidos n.º 4.703.017). Otros marcadores directos incluyen un radionúclido, un resto fluorescente o un resto luminiscente. Además de estos dispositivos de marcado directo, también pueden usarse marcadores indirectos que comprenden enzimas, según la presente invención. Se conocen bien en la técnica diversos tipos de inmunoensayos ligados a enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante, lisozima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, ureasa; estas y otras se han discutido en detalle por Engvall en Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT en Methods in Enzymology, 70:419-439 (1980) y en la Patente de Estados Unidos n.º 4.857.453.

25 En una realización, el método de la presente invención puede comprender un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los métodos de ELISA se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.654.407. En una realización de este método, se mide la concentración de antígeno usando dos tipos de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epitopos del antígeno. En la primera etapa de esta realización, se coloca una muestra que contiene antígeno en una placa de medición sobre la que se han adsorbido anticuerpos (anticuerpos de captura); los antígenos en la muestra se unen a los anticuerpos de captura. En la segunda etapa, se eliminan por lavado las sustancias en la muestra distintas del antígeno con un agente de lavado. Después, en la tercera etapa, se vierte sobre la placa una solución de los anticuerpos de detección, en una realización marcados de manera detectable con moléculas indicadoras, tales como una enzima o radioisótopo; los anticuerpos marcados se unen a los antígenos que se han unido a los anticuerpos primarios. En otra realización, los anticuerpos de detección no están marcados de manera detectable, pero se usa un compañero de unión marcado de manera detectable para identificar la unión del anticuerpo de detección o en otras realizaciones para amplificar su presencia. En una realización, los anticuerpos de detección pueden tener la misma especificidad que los anticuerpos de captura. En otra realización, los anticuerpos de captura y de detección son iguales. En otra realización, los anticuerpos de detección pueden tener una especificidad distinta a la de los anticuerpos de captura.

En otras realizaciones, el sustrato del inmunoensayo pueden ser perlas de vidrio, partículas de látex, varillas de vidrio, papel, micropartículas y similares. El ensayo puede ser un ELISA, de aglutinación de partículas de látex, de microfluidos, cromatográfico o cualquier otra forma de inmunoensayo capaz de identificar la variante o las variantes alélicas de la proteína polimórfica usando al menos un reactivo inmunológico, tal como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una construcción artificial que comprende la región determinante de la complementariedad del anticuerpo.

En una realización, el compañero de unión marcado de manera detectable puede ser un anti-anticuerpo marcado de manera detectable, tal como una IgG de cabra anti-ratón marcada con enzimas para detectar la unión de anticuerpo monoclonal de ratón no marcado. En otras realizaciones, puede usarse una capa adicional de reactivo para cuantificar la unión, tal como un compañero de unión marcado con biotina y una avidina marcada de manera detectable. Estas variantes en métodos ELISA y de inmunoensayo que incluyen métodos de amplificación de la señal se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos marcados en exceso, en una realización, se eliminan completamente con un agente de lavado; después, se mide la cantidad de las moléculas indicadoras que quedan en la placa de medición mediante un lector de actividad enzimática o un contador de centelleo líquido; y se usan los valores observados para la estimación de la cantidad antígenos en la muestra.

En otra realización, el método de la presente invención puede comprender una molécula indicadora sin usar un anticuerpo de captura.

En otra realización, se proporciona un dispositivo de inmunoensayo rápido de centro asistencial, tal como una tira reactiva que pueda emplearse en la consulta de un médico o incluso a domicilio para determinar rápida y fácilmente la presencia de una variante alélica de una proteína polimórfica identificada de manera deseable, tal como Hp 2-2, Hp 2-1 o ambas. En una realización, los resultados se obtienen en menos de una hora y en otra realización, en un tiempo tan breve como aproximadamente 10 minutos. En una realización, se proporciona un dispositivo de flujo lateral que puede utilizar una gota de sangre completa y llevar a cabo un inmunoensayo usando oro coloidal como el marcador detectable de visibilidad. En una realización adicional, puede usarse un dispositivo de lectura conjuntamente con un inmunoensayo de tira reactiva. Se proporciona dispositivos, tales como aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos 6.171.870 y 6.673.628, a modo de ilustración no limitante.

En otra realización, puede utilizarse cualquier método de la presente invención para ensayar la susceptibilidad de un sujeto a las complicaciones diabéticas. En una realización, las complicaciones diabéticas se refieren a complicaciones vasculares. En otra realización, las complicaciones diabéticas se refieren a la restenosis después de una PTCA o del implante de un stent en la arteria coronaria. En otra realización, las complicaciones diabéticas se refieren a la nefropatía diabética. En otra realización, las complicaciones diabéticas se refieren a la mortalidad en un periodo definido después de un infarto agudo de miocardio. En otra realización, las complicaciones diabéticas se refieren a la enfermedad cardiovascular diabética. En otra realización, las complicaciones diabéticas se refieren a la retinopatía diabética. En otra realización, las complicaciones diabéticas se refieren a cualquier otro tipo de complicación de la diabetes en las que pueda estar implicado el tipo de haptoglobina. En determinadas realizaciones, el sujeto es diabético. En otras realizaciones, el sujeto es un diabético de tipo 1 o un diabético de tipo 2. En otras realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 o de tipo 2. En otras realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 o de tipo 2.

En otra realización, el inmunoensayo de Hp descrito en la presente memoria puede usarse en combinación con otros ensayos, incluyendo inmunoensayos para factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, tales como proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) o marcadores de la diabetes, tales como HbA1c, que en combinación con el fenotipado de la haptoglobina puede proporcionar un valor predictivo aumentado.

En una realización adicional, se proporciona un ensayo combinado que comprende la cuantificación de Hp y el fenotipado de Hp.

También se divulga un método para ensayar la utilidad de un anticuerpo o de una proteína recombinante en la distinción entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2, que comprende (a) poner en contacto una primera cantidad del anticuerpo o proteína recombinante con una molécula de Hp 1-1; (b) poner en contacto una segunda cantidad del anticuerpo o proteína recombinante con una molécula de Hp 2-2; (c) poner en contacto una tercera cantidad del anticuerpo con una molécula de Hp 2-2; y (d) determinar de manera cuantitativa una unión o interacción entre el anticuerpo o proteína recombinante y la Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2, indicando un valor obtenido de la determinación cuantitativa que es característico de la presencia de cada una de Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 que el anticuerpo distingue entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2. En una realización de este método, puede probarse la utilidad del anticuerpo o proteína recombinante en la distinción entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 cuando se usa como el anticuerpo de captura en un ELISA sándwich. Puede usarse cualquier método descrito en la presente memoria para probar la utilidad de un anticuerpo o proteína recombinante en la distinción entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2.

En una realización, puede probarse además la capacidad del anticuerpo para distinguir entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-

2 frente a una serie de diferentes concentraciones de haptoglobina. En otra realización, puede probarse la capacidad del anticuerpo para distinguir entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 únicamente a una concentración de haptoglobina.

También se divulga un método para ensayar la utilidad de un anticuerpo o de una proteína recombinante en la distinción entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2, que comprende (a) inmovilizar un anticuerpo anti-haptoglobina sobre un sustrato para formar un complejo anticuerpo-sustrato; (b) poner en contacto una primera cantidad del complejo de anticuerpo-sustrato con una molécula de Hp 1-1; (c) poner en contacto una segunda cantidad del complejo de anticuerpo-sustrato con una molécula de Hp 2-1; (d) poner en contacto una tercera cantidad del complejo de anticuerpo-sustrato con una molécula de Hp 2-2; (e) poner en contacto los productos de las etapas (b), (c) y (d) con el anticuerpo o proteína recombinante de ensayo; e (f) determinar cuantitativamente una unión o interacción entre el anticuerpo o proteína recombinante de ensayo y Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2; indicando un valor obtenido de la determinación cuantitativa que es característico de la presencia de cada una de Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 que el anticuerpo de ensayo distingue entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2.

En una realización, puede probarse además la capacidad del anticuerpo para distinguir entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 frente a una serie de diferentes concentraciones de haptoglobina. En otra realización, puede probarse la capacidad del anticuerpo para distinguir entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 únicamente a una concentración de haptoglobina.

En una realización, la diversidad de anticuerpos de ensayo explorados se genera en un animal que carece del alelo Hp 2-2. El uso de ratones, un animal que carece del alelo Hp 2-2, puede, en una realización, favorecer la generación de anticuerpos que se unen preferencialmente a Hp 2-2 frente a Hp 2-1.

En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende cualquier método para determinar un tipo de haptoglobina de un sujeto, un método para probar la susceptibilidad de un sujeto a las complicaciones diabéticas, un método para probar la utilidad de un anticuerpo o proteína recombinante en la distinción entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 o un método para distinguir entre dos variantes alélicas de una proteína polimórfica en una muestra biológica descrita en la presente invención. Los kits son envases que facilitan un diagnóstico u otro procedimiento proporcionando los materiales o reactivos necesarios en un formato conveniente. También se realizan en la presente memoria tiras reactivas u otros formatos de ensayo por su facilidad de uso y mínimo manejo de muestras y reactivos. En una realización, el sujeto es diabético. En otra realización, el sujeto es diabético de tipo 1 o de tipo 2. En otras realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 o de tipo 2. En otra realización, la muestra biológica es suero. En una realización adicional, la muestra biológica es plasma. En otras realizaciones, el plasma es plasma que se ha anticoagulado con citrato, heparina o EDTA.

En una realización, el kit puede comprender además un aparato para llevar a cabo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En otra realización, el kit puede no comprender un aparato para llevar a cabo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un ácido nucleico, polipéptido, vector, célula o línea celular empaquetadora aislada de la presente invención. En una realización, la composición puede comprender un liposoma u otro vehículo para introducir el ácido nucleico aislado en una célula o para introducir el ácido nucleico en un paciente.

Por lo tanto, se proporciona un método para determinar un tipo de fenotipo de haptoglobina en un sujeto que comprende

a. poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con un anticuerpo anti-haptoglobina de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, formando un complejo unido entre el anticuerpo anti-haptoglobina y la haptoglobina en la muestra biológica;

b. determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicha haptoglobina y dicho anticuerpo anti-haptoglobina; y

c. comparar dicha afinidad de unión determinada cuantitativamente con un valor obtenido a partir de una afinidad de unión determinada cuantitativamente de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo a una isoforma Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 aislada, en donde la afinidad de unión determinada es indicativa del tipo de alelo de Hp, determinando de este modo el tipo de alelo de Hp en dicho sujeto. En otra realización, la muestra biológica es suero. En una realización adicional, la muestra biológica es plasma. En otras realizaciones, el plasma es plasma que se ha anticoagulado con citrato, heparina o EDTA.

En una realización, el sujeto es diabético. En otra realización, el sujeto es diabético de tipo 1 o de tipo 2. En otras realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 o de tipo 2.

En una realización adicional, en complejo unido de anticuerpo anti-haptoglobina-antígeno puede estar inmovilizado sobre un sustrato. La inmovilización puede comprender la unión de un anticuerpo anti-haptoglobina o un fragmento de unión a antígeno del mismo al sustrato. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-haptoglobina es un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina, tal como 4G12.



En realizaciones adicionales del método anteriormente mencionado, las etapas adicionales incluyen:

- a. poner en contacto dicho complejo inmovilizado con una cantidad adicional de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo; y
- 5 b. determinar una afinidad de unión entre dicho antígeno y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo.

El anticuerpo anti-haptoglobina adicional puede ser cualquiera de los anticuerpos descritos a lo largo de la presente memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 Tal como se ha indicado anteriormente en determinadas realizaciones, el anticuerpo, la proteína recombinante o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la isoforma de Hp 2-2 se proporciona a una dilución por debajo de la concentración en donde no se observa afinidad de unión diferencial. En determinadas realizaciones, la dilución es 10-1000 veces menor. En otras realizaciones, es 10-10.000 veces menor. En otras realizaciones determinadas, es 1.000-5.000 veces menor.

15 En otras realizaciones, se proporciona para determinar la susceptibilidad de un sujeto a una complicación diabética, tal como una complicación vascular, comprendiendo el método la etapa de determinar el tipo de alelo de haptoglobina del sujeto según cualquiera de los métodos realizados en la presente memoria, en donde la presencia de Hp 2-2 indica una mayor susceptibilidad a una complicación diabética. En determinadas realizaciones, la complicación diabética es una enfermedad vascular, una nefropatía, una retinopatía, una enfermedad cardiovascular o una combinación de las mismas. En una realización, el sujeto es diabético. En otra realización, el sujeto es diabético de tipo 1 o de tipo 2. En otras realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 o de tipo 2.

También se divulga un método para probar la utilidad de un anticuerpo o una proteína recombinante en la distinción entre los tipos de alelo de haptoglobina Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2, comprendiendo el método las etapas de:

- 25 a. poner en contacto el anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma con una concentración conocida de la molécula de Hp 1-1, de la molécula Hp 2-1 y de la molécula Hp 2-2 aisladas, formando un complejo; y
- 30 b. determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma y dichas Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2; indicando una afinidad de unión significativamente diferente a cada una de Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 que dicho anticuerpo o proteína recombinante es capaz de distinguir entre Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2.

El método anteriormente mencionado puede comprender además la inmovilización del complejo de dicha Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 y dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma.

El método anteriormente mencionado puede comprender además:

- 35 a. poner en contacto dicho complejo con una cantidad adicional de dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma posteriormente a dicha inmovilización; y
- b. determinar una afinidad de unión entre dicha Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo o proteína recombinante.

40 En las realizaciones anteriores, el anticuerpo adicional puede ser cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

En el método anterior, el anticuerpo, la proteína recombinante o el fragmento de unión a antígeno de la misma puede proporcionarse a una dilución por debajo de la concentración en donde no se observa la afinidad de unión diferencial. En una realización, es de 10-10.000 veces menor. En otra realización, es de 1.000-5.000 veces menor.

45 En otra realización, se proporciona un método para probar el potencial de un sujeto diabético de beneficiarse de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir la incidencia de la enfermedad cardiovascular, que comprende la etapa de determinar el fenotipo de haptoglobina del sujeto según cualquiera de los métodos anteriores, en donde la presencia de Hp 2-2 indica un mayor beneficio de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir la incidencia de complicaciones cardiovasculares. En otra  
50 realización, las complicaciones cardiovasculares incluyen insuficiencia cardíaca crónica, muerte cardiovascular, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, restenosis asociada a la angioplastia coronaria, retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética, menos vasos sanguíneos colaterales de la arteria coronaria e isquemia de miocardio. En otras realizaciones, la reducción del estrés oxidativo se logra mediante terapia antioxidante. En otra realización, la terapia antioxidante es la administración de vitamina E o un análogo, metabolito  
55 o derivado de la misma.

Además, se divulga un método para ensayar un anticuerpo o una proteína recombinante respecto de su utilidad para distinguir entre variantes alélicas de una proteína polimórfica, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 a. poner en contacto el anticuerpo, proteína recombinante o un fragmento de unión a antígeno de la misma con una concentración conocida de variantes alélicas aisladas de una proteína polimórfica; y
- b. determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma y dichas variantes alélicas; indicando una afinidad de unión significativamente diferente a cada una de las variantes alélicas que dicho anticuerpo o proteína recombinante es capaz de distinguir entre ellas.

10 En una realización adicional del método anterior, el complejo de dichas variantes alélicas y dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma puede estar inmovilizado sobre un sustrato.

En otra realización, el método puede comprender además

- 15 a. poner en contacto dicho complejo con una cantidad adicional de dicho anticuerpo, proteína recombinante o fragmento de unión a antígeno de la misma posteriormente a dicha inmovilización; y
- b. determinar una afinidad de unión entre dichas variantes alélicas y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo o proteína recombinante.

20 En las realizaciones anteriores, el anticuerpo, la proteína recombinante o el fragmento de unión a antígeno de la misma se proporciona a una dilución por debajo de la concentración en donde no se observa la afinidad de unión diferencial. En una realización, es de 10-10.000 veces menor. En otra realización, es de 1.000-5.000 veces menor.

25 En otra realización, se proporciona un kit que comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria e instrucciones para el uso de dicho anticuerpo monoclonal para determinar el fenotipo de haptoglobina de un sujeto. En otras realizaciones, el kit puede incluir instrucciones que indican que los resultados de la prueba son útiles para determinar el potencial del sujeto para beneficiarse de la reducción del estrés oxidativo o de una terapia antioxidante para las complicaciones vasculares, en donde la presencia de Hp 2-2 indica un mayor beneficio de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante y de este modo reducir la incidencia de complicaciones cardiovasculares.

## Ejemplos

### Ejemplo 1.

#### 30 Preparación y exploración de anticuerpos monoclonales.

Inmunización y preparación del hibridoma. Se produjeron anticuerpos monoclonales usando ratones Balb c según procedimientos convencionales. Las inmunizaciones se llevaron a cabo usando haptoglobina (Hp) 1-1 purificada por afinidad. Se exploraron los sangrados de la cola de los ratones respecto del título de anticuerpo para Hp usando un ensayo ELISA convencional. Específicamente, se recubrieron placas de microtitulación de plástico con 200 ng/pocillo de Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 durante una noche a 4 °C usando un tampón bicarbonato. Después se bloquearon las placas con leche al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sangrados de la cola de los ratones se diluyeron en serie y se incubaron en las placas. Se lavaron las placas y se detectó el anticuerpo de ratón para los respectivos fenotipos de Hp usando IgG de cabra anti-ratón marcada con HRP (H + L) a una dilución de 1:2000. Se lavaron de nuevo las placas y se añadió el sustrato de HRP (tetrametil bencidina, TMB) y peróxido de hidrógeno durante 10 - 30 minutos. Las placas se leyeron en un lector de placas de microtitulación a 620 nm. La señal positiva se basó en cualquier absorbancia sobre 3 veces el fondo (blanco de tampón).

45 La fusión se inició en ratones cuyos títulos de sangrado de la cola fueran mayores de 1:30.000. Las fusiones se llevaron a cabo según protocolos convencionales. Se emplacaron los clones y se usaron los sobrenadantes a una dilución de 1:2 para detectar las células productoras de anticuerpo. El ensayo de exploración para clones de anticuerpo fue el mismo que el ensayo del sangrado de la cola, salvo que se exploró una placa adicional usando IgM de cabra anti-ratón marcada con HRP. Se exploraron 480 clones frente a Hp 1-1 purificada. Se expandieron los 140 clones más fuertes y volvieron a explorarse de nuevo frente a placas recubiertas de Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 usando tanto IgG como IgM anti-ratón para detectar los clones productores de anticuerpo. Se seleccionaron 21 para su exploración adicional basándose en (1) la reactividad (absorbancia a 620 nm > 1.5000) frente a todos los 3 antígenos y (2) ausencia de respuesta de IgM.

55 Ensayo para determinar qué clones productores de anticuerpo proporcionaron anticuerpos adecuados para su uso en un inmunoensayo enzimático en sándwich: El ensayo está diseñado para explorar respecto de anticuerpos que pueden unirse a haptoglobina humana que se presenta al anticuerpo del mismo modo que se presenta en un inmunoensayo en sándwich clásico. Es decir, un anticuerpo unido a un soporte sólido se une a antígeno nativo (haptoglobina) de muestras de paciente que, a su vez, está unido por un anticuerpo marcado con enzima. El anticuerpo de conejo anti-haptoglobina humana se une a Hp de sueros de pacientes de fenotipo conocido y los

anticuerpos monoclonales anti-Hp humana se unen a la Hp unida al anticuerpo de conejo y, a su vez, se detecta por anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con enzima. Esto permite la exploración de muchos sobrenadantes para anticuerpos sin tener que marcar los anticuerpos individuales del sobrenadante con enzima. En los ensayos ELISA anteriormente descritos, la Hp humana se inmoviliza sobre una placa de microtitulación y puede desnaturalizarse en el proceso. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales que detectan a Hp inmovilizada sobre una placa pueden no ser adecuados para detectar la Hp unida a un anticuerpo de captura en un ELISA sándwich.

Se recubrieron placas de microtitulación con 1 ug/pocillo de anticuerpo de conejo anti-haptoglobina humana purificado con DEAE (Sigma) usando un tampón que contenía fosfato, pH = 6,5. Se diluyeron sueros humanos de Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 a 1:500 en tampón de dilución de muestra (PBS con BSA al 1%, Tween 20 al 0,1% y un conservante) y se añadieron a las placas 100 ul de muestra diluida a las placas recubiertas con anticuerpo de conejo anti-Hp. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (18°C - 25°C) con agitación (750 rpm). Entonces se vaciaron las placas y se lavaron 5 veces con tampón de lavado (PBS y Tween 20 al 0,1%). Se tomó la precaución de retirar las gotas de tampón restantes. Los sobrenadantes de los clones se diluyeron en tampón de dilución de muestra y se añadieron 100 ul de cada dilución a cada pocillo. Los sobrenadantes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (18°C - 25°C) con agitación (750 rpm). Las placas se vaciaron y lavaron como antes. Se añadieron a cada pocillo 100 ul de IgG de cabra anti-ratón marcada con HRP (Pierce, diluida a 1:15.000 o a 1:20.000 en tampón de dilución de muestra con IgG de conejo purificada con DEAE, Biocheck, Inc.). El conjugado se incubó a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante 30 minutos con agitación (750 rpm) y se vació y lavó como antes. Se añadieron 100 ul de solución TMB (Biocheck, Inc.) y peróxido de hidrógeno a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación (750 rpm). Se añadieron 100 ul de HCl 1N a cada pocillo y se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un lector de microplacas Vmax Kinetic. Se usó anticuerpo anti-haptoglobina humana disponible comercialmente purificado con DEAE (Sigma) como control positivo.

Se titularon veintiún sobrenadantes de clones que mostraron actividad anti-haptoglobina en el ELISA en el ensayo anterior para determinar qué sobrenadantes producían anticuerpos que 1) reaccionan con todos los 3 fenotipos de Hp y 2) proporcionan la señal más fuerte a las diluciones más elevadas. A bajas diluciones, todos los clones salvo 2 proporcionaron señales fuertes con todos los fenotipos excepto para los clones 2F6 y 4D7, que no reaccionaron. Esto ilustra que, aunque pueden detectar a Hp en una placa de ELISA, no eran adecuados para un inmunoensayo enzimático en sándwich. Los blancos elevados de solo tampón indicaron unión no específica debido a la presencia de grandes cantidades de IgG de ratón. La dilución adicional de los sobrenadantes eliminó este falso positivo.

**Veintiún sobrenadantes diluidos a 1:2:**

Muestras:

2º MoAb:	Solo tampón	1-1 n.º 10	1-1 n.º 11	2-1 n.º 2	2-1 n.º 4	2-2 n.º 1	2-2 n.º 3
<b>1A12</b>	1,566	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>1D1</b>	1,568	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>1E9</b>	0,832	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>1E10</b>	0,280	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>1G1</b>	0,485	4,000	3,992	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>2A9</b>	0,450	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>2B3</b>	0,563	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>2E4</b>	0,245	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>2F6</b>	0,369	0,269	0,554	0,277	0,251	0,255	0,316
<b>3A1</b>	0,443	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
<b>3B5</b>	1,558	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000

ES 2 602 200 T3

Muestras:

2º MoAb:		Solo tampón	1-1 n.º 10	1-1 n.º 11	2-1 n.º 2	2-1 n.º 4	2-2 n.º 1	2-2 n.º 3
Placa n.º 2:	<b>0,01 ug/ml MoAb de Sigma</b>	<b>0,174</b>	<b>3,663</b>	<b>3,825</b>	<b>3,840</b>	<b>3,754</b>	<b>3,738</b>	<b>3,769</b>
	<b>3E6</b>	0,558	3,935	4,000	3,960	3,947	3,983	3,969
	<b>3E12</b>	0,215	3,997	3,959	4,000	3,986	4,000	4,000
	<b>3H3</b>	2,254	3,944	3,963	3,972	3,964	4,000	3,983
	<b>4D12</b>	0,279	4,000	4,000	3,949	4,000	4,000	4,000
	<b>4F9</b>	0,178	3,938	3,917	3,973	3,894	4,000	4,000
	<b>4G12</b>	0,307	3,984	3,926	3,969	4,000	4,000	4,000
	<b>4D3</b>	0,489	3,992	3,974	3,980	3,945	3,962	4,000
	<b>4D6</b>	0,314	4,000	3,968	3,905	4,000	4,000	3,952
	<b>4D7</b>	0,245	0,174	0,199	0,171	0,184	0,209	0,205
	<b>5D3</b>	0,673	3,919	4,000	4,000	3,940	4,000	4,000
	<b>0,01 ug/ml MoAb de Sigma</b>	<b>0,178</b>	<b>3,650</b>	<b>3,732</b>	<b>3,746</b>	<b>3,713</b>	<b>3,817</b>	<b>3,822</b>

Para el control negativo, se usó la muestra n-º 3 de 2-2 a 1:1000 sin adición de anticuerpo secundario; sustituido con tampón; y GAM-HRP de Pierce a 1:15.000 con 100 ug/ml de IgG de conejo. Para la placa n.º 1, la DO media fue de 0,127 (1,2% CV), y para la placa n.º 2, 0,126 (3,0% CV).

- 5 Experimentos con sobrenadante más diluido. En este experimento, se detectaron Hp 1-1 y Hp 2-2 usando una dilución de sobrenadante de 1:2000. Una vez que la titulación del sobrenadante se diluye adicionalmente, se descubrieron dos clases de anticuerpo: Clase I, anticuerpos que detectan a Hp 1-1 y a Hp 2-2 con igual intensidad y Clase II, anticuerpos que tienen una actividad mucho menor para Hp 1-1 que para Hp 2-2. Once clones generaron anticuerpos de Clase I y 8 clones generaron anticuerpos de Clase II. El anticuerpo comercial de Sigma anti-humano se comporta como un anticuerpo de Clase I. Estos datos sugieren que los anticuerpos de Clase II detectan de manera diferencial los fenotipos de Hp a los monoclonales de Clase I. Los anticuerpos de Clase II que tienen las propiedades descritas en la presente memoria se realizan completamente en la presente memoria.

2º MoAb: Solo tampón 1-1 n.º 10 2-2 n.º 1

dilución a 1:2000 de sobrenadante / 1:20k

GAM-HRP

<b>1A12 Clase I</b>	0,177	3,321	3,811
<b>1D1 Clase I</b>	0,160	3,132	3,332
<b>1E9 Clase I</b>	0,147	3,899	4,000
<b>1E10 Clase II</b>	0,145	1,755	2,243

## ES 2 602 200 T3

2º MoAb: Solo tampón 1-1 n.º 10 2-2 n.º 1  
 dilución a 1:2000 de sobrenadante / 1:20k  
 GAM-HRP

<b>1G1 Clase II</b>	0,143	1,964	2,403
<b>2A9 Clase I</b>	0,160	3,839	3,934
<b>2B3 Clase II</b>	0,143	1,603	2,270
<b>2E4 Clase I</b>	0,151	3,692	3,759
<b>2F6 N/A</b>	0,133	0,181	0,237
<b>3A1 Clase I</b>	0,144	2,144	2,228
<b>3B5 Clase I</b>	0,154	3,172	3,024
<b>3E6 Clase I</b>	0,140	2,281	2,235
<b>3E12 Clase I</b>	0,148	3,123	3,569
<b>3H3 Clase II</b>	0,156	1,573	2,236
<b>4D12 Clase I</b>	0,160	3,826	3,960
<b>4F9 Clase II</b>	0,140	0,645	2,290
<b>4G12 Clase II</b>	0,133	0,722	2,704
<b>4D3 Clase II</b>	0,135	1,761	2,281
<b>4D6 Clase II</b>	0,128	2,847	3,402
<b>4D7 N/A</b>	0,131	0,179	0,241
<b>5D3 Clase I</b>	0,139	2,858	2,742
	<b>0,169</b>	<b>3,840</b>	<b>3,854</b>

### 0,01 ug/ml MoAb de Sigma

5 Se seleccionaron los 4 monoclonales de Clase I y 1 monoclonal de Clase II (4G12) más fuertes y se titularon a diluciones adicionales frente a todos los 3 fenotipos de Hp. A una dilución de 1:4000 de los sobrenadantes de clones, los 4 monoclonales de Clase I continuaron detectando todos los 3 fenotipos al mismo nivel (CV < 5%) mientras que el monoclonal de Clase II detectó los fenotipos de Hp de manera diferencial siendo la señal de Hp 1-1 < la señal de Hp 2-1 < la señal de Hp 2-2. Estos datos indican que los monoclonales de Clase II podrían diferenciar entre los 3 fenotipos de Hp. El uso de condiciones diluidas del anticuerpo monoclonal en un ensayo que detecta de manera diferencial isoformas o fenotipos de Hp es una realización de la presente memoria.

10 Condición: Ab de recubrimiento: de conejo anti-haptoglobina humana a 1 ug/pocillo; Ab secundario: sobrenadantes de anticuerpo monoclonal o MoAb pan-reactivo de Sigma; Conjugado de HRP: IgG-HRP de cabra anti-ratón de Pierce a 1:20.000 con 100 ug/ml de IgG de conejo.

Muestras:

		Solo tampón	1-1 n.º 10	2-1 n.º 2	2-2 n.º 1	Solo tampón	1-1 n.º 10	2-1 n.º 2	2-2 n.º 1
2º MoAb:		dilución a 1:5000 de sobrenadante				dilución a 1:4000 de sobrenadante			
Placa n.º 2:	<b>1E9</b>	0,122	2,506	2,605	2,458	0,120	2,995	3,103	2,970
	<b>2E4</b>	0,120	2,464	2,360	2,486	0,119	2,900	2,887	2,936
	<b>3E6</b>	0,128	1,384	1,249	1,245	0,115	1,684	1,572	1,543

Muestras:

	Solo tampón	1-1 n.º 10	2-1 n.º 2	2-2 n.º 1	Solo tampón	1-1 n.º 10	2-1 n.º 2	2-2 n.º 1
2º MoAb:	dilución a 1:5000 de sobrenadante				dilución a 1:4000 de sobrenadante			
<b>4G12</b>	0,117	0,415	1,128	1,452	0,117	0,495	1,382	1,819
<b>5D3</b>	0,122	1,417	1,265	1,302	0,145	1,764	1,592	1,596
<b>0,01 ug/ml MoAb de Sigma</b>	<b>0,112</b>	<b>3,975</b>	<b>3,983</b>	<b>4,000</b>	<b>0,140</b>	<b>3,959</b>	<b>3,955</b>	<b>4,000</b>

Control negativo: sin adición de anticuerpo secundario; sustituido con tampón. GAM-HRP de Pierce a 1:20.000 con 100 ug/ml de IgG de conejo:

	Solo tampón	1-1 n.º 10	2-1 n.º 2	2-2 n.º 1
1:5.000	0,120	0,086	0,095	0,088
1:4.000	0,116	0,083	0,096	0,089

5 Estudios adicionales en clones de Clase II; usados como anticuerpos de captura. Se escalaron varios clones de Clase II en cultivo celular. Se purificaron anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes usando columnas de proteína G. Los anticuerpos monoclonales purificados se recubrieron por separado en placas de microtitulación y también se acoplaron a peroxidasa de rábano picante (HRP). Se ensayaron diferentes combinaciones de anticuerpo monoclonales de captura y conjugados para determinar el par óptimo para un ensayo en sándwich para identificar los fenotipos de Hp en suero humano. El mejor anticuerpo monoclonal conjugado/de captura fue 4G12.

15 Se acopló 4G12 monoclonal a placas de microtitulación a 1 ug/ml en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH = 6,5. Las placas se recubrieron durante una noche y se secaron. Las placas secas se almacenaron en bolsas de plástico con desecante. El conjugado 4G12 se preparó tratando 1 mg de 4G12 monoclonal purificado con peryodato sódico, seguido de tratamiento con borohidruro sódico. El conjugado se dializó y purificó en una columna S-300, se concentró a 0,5 mg/ml en tampón de conjugado (Biocheck, Inc). El conjugado se almacenó a 2-8°C. Se tituló el conjugado para determinar la concentración óptima.

20 Se diluyeron doce sueros humanos con fenotipo de Hp conocido a 1:1000 en tampón de dilución. Se añadieron 100 ul de suero diluido a una placa de microtitulación recubierta con anticuerpo monoclonal 4G12. Las placas se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se vaciaron las placas y se lavaron 5 veces con tampón de lavado. Se vació la placa y se añadieron 100 ul de diferentes diluciones de conjugado de 4G12 marcado con HRP a los pocillos. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y se lavó 5 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de sustrato TMB y peróxido de hidrógeno a cada pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Se añadieron a cada pocillo 100 ul de HCl 1 N y se leyó la placa en un lector de microplacas a 450 nm en 15 minutos.

25 **Conjugado de HRP:**

Muestra n.º	Ab-HRP 4G12 1:5.000	a	Ab-HRP 4G12 1:10.000	a
Solo tampón	0,064		0,052	
1-1 n.º 10	0,107		0,080	
1-1 n.º 11	0,112		0,082	
1-1 n.º 44	0,131		0,149	
2-1 n.º 2	1,493		0,804	

ES 2 602 200 T3

Muestra n.º	Ab-HRP 4G12 1:5.000	a	Ab-HRP 4G12 1:10.000	a
2-1 n.º 4	2,658		1,304	
2-1 n.º 24	2,117		1,084	
2-1 n.º 36	1,987		0,965	
2-2 n.º 1	3,955		2,361	
2-2 n.º 3	3,457		1,813	
2-2 n.º 5	4,000		2,702	
2-2 n.º 6	4,000		2,945	
2-2 n.º 15	4,000		3,401	

5 Los datos de este experimento muestran que a ambas concentraciones de conjugado de 4G12, pueden diferenciarse las muestras de Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2. Específicamente, a una concentración de 1:5000, todas las muestras de Hp 1-1 tenían una absorbancia menor de 0,131, las muestras de Hp 2-1 variaban entre 1,493 - 2,658 y las muestras de Hp 2-2 se encontraban todas por encima de 3,457. Todos los fenotipos de las 12 muestras se identificaron correctamente.

En un experimento adicional, se investigó el efecto de la dilución de la muestra en la selectividad por el fenotipo de Hp. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Fenotipo de Hp	N.º de ID de Muestra	A450 de muestra no diluida	A450 de muestra diluida a 1:10	A450 de muestra diluida a 1:25	A450 de muestra diluida a 1:50	A450 de muestra diluida a 1:100	A450 de muestra diluida a 1:1.000
	Solo tampón	0,045	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Hp 1-1	Control 1-1	0,154	0,082	0,073	0,066	0,064	0,055
Hp 2-1	Control 2-1	1,121	1,604	1,629	1,567	1,505	1,005
Hp 2-2	Control 2-2	3,087	3,093	2,986	2,859	2,690	2,057
Hp 2-2	9	N/A	2,133	1,989	1,790	1,679	0,871
Hp 2-2	12	N/A	2,433	2,284	2,136	1,968	1,144
Hp 2-2	13	N/A	2,562	2,353	2,196	2,052	1,344
Hp 2-2	19	N/A	2,462	2,281	2,092	1,940	1,169
Hp 2-2	23	N/A	2,654	2,454	2,327	2,162	1,255
Hp 2-2	24	N/A	2,663	2,462	2,321	2,136	1,160
Hp 2-2	25	N/A	2,540	2,322	2,221	2,044	1,168
Hp 2-2	31	N/A	2,451	2,341	2,210	2,072	1,327
Hp 2-2	34	N/A	2,338	2,235	2,110	1,979	1,187
Hp 2-2	45	N/A	1,576	1,590	1,567	1,503	1,184

ES 2 602 200 T3

Fenotipo de Hp	N.º de ID de Muestra	A450 de muestra no diluida	A450 de muestra diluida a 1:10	A450 de muestra diluida a 1:25	A450 de muestra diluida a 1:50	A450 de muestra diluida a 1:100	A450 de muestra diluida a 1:1.000
Hp 2-2	118	N/A	1,614	1,618	1,599	1,563	1,327
Hp 2-2	147	N/A	1,476	1,490	1,458	1,436	1,061
Hp 2-2	148	N/A	1,746	1,750	1,715	1,682	1,335
Hp 2-2	264	N/A	1,553	1,574	1,553	1,532	1,229
Hp 2-2	268	N/A	1,555	1,536	1,501	1,427	1,024
Hp 2-2	BRH 196266	2,430	2,193	2,101	1,957	1,795	1,063
Hp 2-2	BRH 196284	2,361	2,175	2,029	1,874	1,665	0,326
Hp 2-2	BRH 196291	1,791	1,808	1,760	1,632	1,499	0,715
Hp 2-2	BRH 196293	2,292	2,124	2,002	1,864	1,696	0,913
Hp 2-1	BRH 196268	1,412	1,750	1,801	1,764	1,722	1,353
Hp 2-1	BRH 196292	1,233	1,612	1,664	1,606	1,604	1,249
Hp 2-1	BRH 196307	1,416	1,730	1,784	1,762	1,690	1,290
Hp 2-1	BRH 196314	1,320	1,739	1,796	1,779	1,697	1,305

En la siguiente tabla se muestra un resumen de estos datos.

Observación de máxima Hp 2-1 mínima Hp 2-2 frente a

BRH 196291	1,791	1,808	1,760	1,632	1,499	0,715	Hp 2-2
BRH 196268	1,412	1,750	1,801	1,764	1,722	1,353	Hp 2-1

DO Hp 2-2/Hp 2-1      1,26841    1,03314    0,97723    0,92517    0,87049    0,52845  
                                  3598        2857        487        0068        9419        5285

Resolución (%)            27%        3,30%      -2%        -7%        -13%       -47%

5 Se examinaron todas las variables, tales como la concentración de la muestra, los diluyentes del conjugado, los tiempos de incubación y la estabilidad de la muestra. El ensayo demuestra una excelente reproducibilidad, linealidad y precisión. El ensayo tarda 2 horas en realizarse y tiene una sensibilidad, especificidad y precisión para los 3 fenotipos de más del 95%.

10 Por lo tanto, como resultado de la inmunización de ratones con antígeno Hp 1-1, se identificaron dos clases de monoclonales anti-haptoglobina, una clase con la capacidad para diferenciar entre las tres variantes de Hp en plasma humano. La capacidad de los monoclonales para diferenciar se potenció seleccionando la concentración óptima del conjugado monoclonal de HRP-clase II usado en el ensayo. El uso de dicha concentración optimizada se realiza en la presente memoria.



**Ejemplo 2****Secuencia de anticuerpo**

Se determinaron las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 4G12 mediante métodos convencionales tal como se describe a continuación.

- 5 Preparación del ARNm. Se extrajo el ARNm de  $3 \times 10^6$  células de hibridoma de 4G12. Se digirió el ARNm del seudogen de la región variable producido por las células de mieloma. Se llevó a cabo RACE 5' en el que se ligó un adaptador al extremo 5' del ARNm de la región variable.

- 10 RT-PCR. Se llevó a cabo transcripción inversa para crear ADNc, que se amplificó usando reacciones PCR externas e internas. Cada reacción PCR usó un cebador específico de adaptador y un cebador específico de región constante de inmunoglobulina. Se extrajo del gel el producto de la PCR externa de cadena pesada (tamaño aproximado de 500 pb) y se purificó. Se llevó a cabo una PCR interna en la cadena ligera para crear producto de PCR adicional. Se extrajo del gel el producto de la PCR interna de cadena ligera (tamaño aproximado de 500 pb) y se purificó.

- 15 Clonación. Los productos de PCR purificados resultantes de la región variable de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina se ligaron en los vectores de clonación TOPO TA de Invitrogen y se transformaron en células TOP10. Los clones se exploraron mediante PCR para hallar aquellos con el inserto del tamaño correcto. Se escalaron tres clones para la cadena ligera y tres clones para la cadena pesada, que contenían el inserto de tamaño correcto, se purificaron y secuenciaron en ciclo.

- 20 La secuencia nucleotídica de cadena ligera se ilustra en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2. Las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera 1, 2 y 3 son las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

La secuencia nucleotídica de cadena pesada se ilustra en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 7. Las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada 1, 2 y 3 son las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente.

**Ejemplo 3****25 Inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de haptoglobina 2-2 en suero y plasma diabético**

- 30 Lo siguiente describe un kit de inmunoensayo típico utilizando un anticuerpo monoclonal para Hp ilustrado en la presente memoria que detecta de manera diferencial a Hp 2-2. La descripción del kit, sus componentes y otras características son únicamente ejemplares y no limitantes en lo referente a las realizaciones abarcadas en la presente memoria. El inmunoensayo puede ponerse en práctica en cualquiera de una serie de otros formatos sin desviarse de las enseñanzas de la presente memoria.

Uso previsto. El kit es un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de haptoglobina 2-2 en suero y plasma humano para su uso conjunto con la evaluación clínica y la determinación del riesgo del paciente y como ayuda para predecir el riesgo de infarto de miocardio y de muerte a causa de enfermedades cardiovasculares en individuos con diabetes. El kit solo debe usarse en un laboratorio profesional.

- 35 Principio del ensayo. El kit es un inmunoensayo enzimático en sándwich cualitativo que utiliza un anticuerpo monoclonal único dirigido contra un determinante antigénico en la molécula de haptoglobina. El anticuerpo anti-haptoglobina humana se usa para la inmovilización de fase sólida (en las placas de microtitulación). Se conjuga el mismo anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina humana a peroxidasa de rábano picante (HRP) y se encuentra en la solución de conjugado enzimático. Se dejan reaccionar secuencialmente las muestras de ensayo con el monoclonal de captura en las placas de microtitulación y la solución de conjugado enzimático resultante en la molécula de Hp que se va a poner en sándwich entre la fase sólida y el anticuerpo ligado a enzimas.

- 45 Después de dos etapas separadas de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, se enjuagan los pocillos con tampón de lavado para retirar la proteína Hp no unida y el anticuerpo marcado no unido, respectivamente. El reactivo TMB se añade y se incuba durante 15 minutos con agitación, dando como resultado el revelado de un color azul. El revelado del color se detiene con la adición de solución de paro, cambiando el color a amarillo y es proporcional a la concentración de proteína Hp. La absorbancia se mide usando un espectrofotómetro a 450 nm. El intervalo de corte de absorbancia para el fenotipo Hp 2-2 de Hp se determina multiplicando la absorbancia del control de Hp 2-2 por un factor predeterminado. La absorbancia de cada muestra se compara con el valor de corte para determinar si la muestra es o no del fenotipo Hp 2-2.

- 50 Rendimiento de la prueba. La sensibilidad analítica, o el límite del blanco del kit es 0,050, determinado tomando la media de 10 determinaciones de blanco de tampón más 2 desviaciones estándar ( $0,044 + 2 \times 0,003 = 0,050$ ). Se determinó la variabilidad intra-ensayo o inter-ensayo (precisión) del kit en dos sitios probando 3 muestras de suero humano y un blanco de tampón. Las muestras se ensayaron 8 veces usando un solo lote de reactivos durante 10 días. Los datos de precisión se resumen a continuación.

<b>Sítio n.º 1</b>		<b>Abs de la muestra (450 nm)</b>	<b>%CV Intra-ensayo</b>		<b>%CV Inter-ensayo</b>
<b>Tampón</b>	<i>n</i> = 8	0,044	2,4%	<i>n</i> = 80	7,5%
<b>Hp 1-1</b>	<i>n</i> = 8	0,059	2,0%	<i>n</i> = 80	4,6%
<b>Hp 2-1</b>	<i>n</i> = 8	1,103	2,3%	<i>n</i> = 80	2,6%
<b>Hp 2-2</b>	<i>n</i> = 8	2,376	1,2%	<i>n</i> = 80	2,9%
<b>Sítio n.º 2</b>		<b>Abs de la muestra (450 nm)</b>	<b>%CV Intra-ensayo</b>		<b>%CV Inter-ensayo</b>
<b>Tampón</b>	<i>n</i> = 8	0,048	8,3%	<i>n</i> = 80	10,1%
<b>Hp 1-1</b>	<i>n</i> = 8	0,057	6,7%	<i>n</i> = 80	8,0%
<b>Hp 2-1</b>	<i>n</i> = 8	1,243	2,8%	<i>n</i> = 80	6,8%
<b>Hp 2-2</b>	<i>n</i> = 8	2,470	2,3%	<i>n</i> = 80	4,5%

5 Para determinar el límite de detección, se diluyeron dos muestras de Hp 2-2 de 1:10 a 1:4000 y se ejecutaron tanto en electroforesis como en el kit. Las dos muestras se identificaron correctamente como Hp 2-2 hasta una dilución de 1:50 mediante electroforesis y hasta una dilución de 1:1000 en el kit. También se diluyeron dos muestras de Hp 1-1 y dos de Hp 2-1 de 1:10 hasta 1:4000 y también se identificaron correctamente como no de Hp 2-2 mediante el kit a todas las diluciones ensayadas.

10 Se determinó el valor de corte del kit probando 411 muestras de fenotipo de Hp conocido y analizando los datos usando gráficas de Característica de funcionamiento del receptor (ROC). Se determina el valor de corte de Hp 2-2 para su uso por los laboratorios con el kit multiplicando el valor medio de control positivo de Hp 2-2 por un factor de ajuste de 0,6. El factor de ajuste tiene en cuenta la variación del ensayo de ejecución en ejecución así como de día en día.

15 Sustancias interferentes. Se evaluó la interferencia en el kit de las sustancias endógenas halladas en la sangre y de las sustancias exógenas (fármacos con y sin receta). Se añadieron interferentes potenciales a seis muestras de suero, dos de cada fenotipo de Hp (Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2) con una absorbancia de EIA de Hp en el intervalo de 0,045 a 2,521. Tal como se muestra a continuación, no se observó una interferencia apreciable para las siguientes sustancias a los niveles de adición ensayados.

<b>Interferente endógeno</b>	
<b>Bilirrubina</b>	<b>20 mg/dl (0,2 g/l)</b>
<b>Colesterol</b>	<b>500 mg/dl (5 g/l)</b>
<b>Triglicéridos</b>	<b>2000 mg/ml (20 g/l)</b>
<b>BSA</b>	<b>1500 mg/dl</b>
<b>Hemoglobina</b>	<b>1280 mg/dl (12,8 g/l)</b>
<b>Interferente exógeno</b>	
<b>Ácido ascórbico (Vitamina C)</b>	<b>342 umol/l</b>
<b>Atorvastatina (Lipitor)</b>	<b>20 umol/l</b>
<b>Niacina</b>	<b>6500 umol/l</b>

<b>Pravastatina</b>	<b>10 umol/l</b>
<b>Warfarina</b>	<b>32,5 umol/l</b>
<b>Acetaminofeno</b>	<b>1324 umol/l</b>
<b>Tolbutamida</b>	<b>2,37 mmol/l</b>
<b>Aspirina</b>	<b>3,62 mmol/l</b>
<b>Fenofibrato</b>	<b>125 umol/l</b>
<b>Difenhidramina</b>	<b>19,6 umol/l</b>
<b>Lisinopril</b>	<b>0,74 umol/l</b>
<b>Motormen</b>	<b>310 umol/l</b>

5 Precisión clínica. Se llevaron a cabo tres estudios para comparar el rendimiento del kit y los métodos de referencia (electroforesis en gel de poliacrilamida o reacción en cadena de la polimerasa, PCR) para identificar qué pacientes poseen el fenotipo de haptoglobina 2-2. Las muestras consistían en muestras de suero y plasma de individuos diabéticos de tipo I, diabéticos de tipo II y no diabéticos. Se ensayó un total de 4134 muestras en tres sitios que consistían en lo siguiente: Diabéticos de tipo I (354 muestras, 8,6%); Diabéticos de tipo II (3.205 muestras, 77,5%); e individuos no diabéticos (575 muestras, 13,9%).

10 Se analizaron los datos para determinar la sensibilidad, especificidad y concordancia entre el método de ensayo y los métodos de referencia. Tres estudios clínicos proporcionaron parámetros de rendimiento similares cuando se compara el kit con los métodos de referencia. Estos resultados demuestran que puede usarse el kit para determinar el estado de genotipo de Hp 2-2 en pacientes diabéticos de tipo I y de tipo II así como en pacientes no diabéticos. Por lo tanto, el kit es una prueba sensible y específica para el genotipo Hp 2-2.

	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Concordancia</b>
<b>Estudio 1</b>	316/317 = 99,7%	349/350 = 99,7%	665/667 = 99,7%
<b>Estudio 2</b>	1521/1535 = 99,1%	1548/1570 = 98,6%	3069/3105 = 98,8%
<b>Estudio 3</b>	148/155 = 95,5%	198/199 = 99,5%	346/354 = 97,7%

15 Además, en un estudio clínico se analizaron los datos adicionalmente preparando y comparando gráficas compuestas primarias y gráficas de Kaplan-Meier tanto del método de ensayo como del método de referencia. Estas gráficas demostraron que el kit es comparable con el método de referencia para evaluar el riesgo cardiovascular en diabéticos.

La siguiente descripción proporciona detalles operativos adicionales de un kit ejemplar ilustrado en la presente memoria.

20 La haptoglobina (Hp) es una proteína sérica de fase aguda de origen normal cuyo papel fisiológico normal es secuestrar la hemoglobina libre (Hb), un potente agente oxidante, de la circulación. La Hb libre, liberada durante la hemólisis de los glóbulos rojos, promueve la acumulación de radicales hidroxilo libres, que pueden provocar daño oxidativo a los tejidos. La Hp actúa como antioxidante formando en primer lugar complejos con Hb y después eliminándose de la circulación mediante captación a través del receptor CD163 de macrófagos. La Hp es polimórfica en seres humanos y aparece con cualquiera de tres fenotipos, Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2. La prevalencia de los tres fenotipos de Hp es del 16% de Hp 1-1, 48% de Hp 2-1 y 36% de Hp 2-2. Hay pruebas considerables que apoyan el papel patógeno para el fenotipo Hp 2-2. La eliminación del complejo Hb-Hp es dependiente del fenotipo de Hp. El fenotipo Hp 2-2 parece ser un antioxidante inferior en comparación con el fenotipo Hp 1-1. El Hp 1-1 también es más eficaz para prevenir la liberación del grupo hemo de los complejos Hp-Hb y en su eliminación por el receptor CD163 de macrófagos. Finalmente, estudios recientes mostraron un transporte inverso de colesterol impedido en diabéticos con Hp 2-2.

35 La presencia del fenotipo Hp 2-2 en individuos diabéticos predice el riesgo cardiovascular. Diversos estudios longitudinales han determinado que el fenotipo Hp 2-2 es un factor de riesgo independiente para la enfermedad de las arterias coronarias, el infarto de miocardio y la muerte a causa de enfermedades cardiovasculares en individuos diabéticos. Aunque la distribución de los fenotipos de Hp no es diferente en individuos con o sin diabetes de tipo 1, se demostró que el fenotipo Hp 2-2 es un factor de riesgo únicamente en pacientes con diabetes. Esto puede

5 producirse debido a que en un paciente diabético, la glucosilación de la hemoglobina y la reducción de CD163 en macrófagos puede contribuir al aumento del estrés oxidativo y del daño tisular por complejos hemoglobina-haptoglobina. Se ha demostrado que la oxidación de LDL por la hemoglobina glucosilada no se bloquea completamente mediante la unión a Hp 2-2 y la eliminación impedida de los complejos da como resultado su localización en las partículas de HDL. Hb y los peróxidos de lípidos asociados con HDL aumentaron y la función de HDL estaba impedida en individuos diabéticos con Hp 2-2. Los individuos con diabetes y Hp 2-2 muestran HDL disfuncional, lo que aumenta su riesgo de enfermedad cardiovascular.

10 El kit de ensayo se basa en el principio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida. El ensayo es un inmunoensayo enzimático en sándwich cualitativo que utiliza un anticuerpo monoclonal único dirigido contra un determinante antigénico en la molécula de haptoglobina. Este anticuerpo monoclonal de ratón anti-haptoglobina humana se usa para la inmovilización de fase sólida (en las placas de microtitulación). Se conjuga el mismo anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina humana a peroxidasa de rábano picante (HRP) y se encuentra en la solución de conjugado enzimático. Se dejan reaccionar secuencialmente las muestras de ensayo con el monoclonal de captura en las placas de microtitulación y la solución de conjugado enzimático resultante en la molécula de Hp  
15 que se va a poner en sándwich entre la fase sólida y el anticuerpo ligado a enzimas.

20 Después de dos etapas separadas de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, se enjuagan los pocillos con tampón de lavado para retirar la proteína Hp no unida y el anticuerpo marcado no unido, respectivamente. El reactivo TMB se añade y se incuba durante 15 minutos con agitación, dando como resultado el revelado de un color azul. El revelado del color se detiene con la adición de solución de paro, cambiando el color a amarillo y es proporcional a la concentración de proteína Hp. La absorbancia se mide usando un espectrofotómetro a 450 nm. El intervalo de corte de absorbancia para el fenotipo Hp 2-2 de Hp se determina multiplicando la absorbancia del control de Hp 2-2 por un factor predeterminado. La absorbancia de cada muestra se compara con el valor de corte para determinar si la muestra es o no del fenotipo Hp 2-2.

**Reactivos y materiales proporcionados:**

- 25 1. Micropocillos recubiertos de Ab para Hp (96 pocillos, placa de 1 tira, 8 x 12 tiras de pocillos)
2. Pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón anti-haptoglobina humana en una bolsa cerrada con desecante.
3. Diluyente de muestra (1 x 50 ml/botella, 1 botella, tapón verde) (ÚNICAMENTE para dilución de la muestra). Contiene solución de tampón fosfato-BSA con conservantes
- 30 4. Concentrado de conjugado enzimático 250X (1 x vial de 0,250 ml, punto rojo en el tapón). Contiene anticuerpo monoclonal de ratón anti-haptoglobina conjugado a peroxidasa de rábano picante
5. Diluyente de conjugado de enzima (1 x vial de 13 ml, tapón rojo) ÚNICAMENTE para la dilución de concentrado de conjugado enzimático
6. Diluyente que contiene proteína con conservantes
- 35 7. Tampón de lavado 20x (1 x botella de 50 ml, tapón transparente)
8. Tampón fosfato con detergentes
9. Reactivo TMB (una etapa) (1 x vial de 11 ml, botella marrón opaca). Contiene solución de TMB en una etapa
10. Solución de paro, HCl 1 N (1 x vial de 11 ml, tapón transparente). Contiene ácido clorhídrico diluido.
- 40 11. Control positivo de Hp 1-1 (1 x vial de 0,250 ml, punto de color blanco en el tapón). Suero humano con conservante.
12. Control positivo de Hp 2-1 (1 x vial de 0,250 ml, punto de color amarillo en el tapón). Suero humano con conservante.
13. Control positivo de Hp 2-2 (1 x vial de 0,250 ml, punto de color verde en el tapón). Suero humano con conservante.

45 **Materiales necesarios pero no proporcionados:**

1. ÚNICAMENTE agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión: 5 ul, 10 ul, 100 ul y 1,0 ml y puntas de pipeta desechables
3. Es aceptable un lector de pocillos de microtitulación con un ancho de banda de 10 nm o menos y un intervalo de densidad óptica de 0 a 3 DO o mayor a longitudes de onda de 450 m.

4. Agitador de placas EIA capaz de agitar microplacas a 750 rpm
5. Mezclador vorticial o equivalente
6. Papel absorbente

**Advertencias y precauciones:**

- 5 PRECAUCIÓN: Este kit contiene suero humano. El suero humano dio negativo en pruebas para HBsAg, VIH 1/2 y VHC mediante métodos aprobados por la FDA. Sin embargo, ningún método puede asegurar completamente la ausencia de estos agentes; por lo tanto, todos los productos de sangre humanos, incluyendo muestras de suero y de plasma, deben considerarse como potencialmente infecciosos. Su manejo debe ser conforme a una guía o regulación de seguridad de riesgos biológicos adecuada, en caso de que exista.
- 10 Evitar el contacto con el HCl 1 N. Puede causar irritación y quemaduras en la piel. En caso de producirse el contacto, lavar con cantidades abundantes de agua y buscar atención médica en caso de que persista la irritación.  
  
No usar los reactivos después de su fecha de caducidad y no mezclar o usar componentes de kit con números de lote distintos.  
  
Usar puntas limpias nuevas para diferentes especímenes. No usar aspiración con la boca para pipetear.
- 15 No fumar, comer o beber en las zonas en las que se manipulan los especímenes o reactivos del kit.  
  
Usar guantes desechables cuando se manejen especímenes y lavar las manos exhaustivamente después de la manipulación.  
  
Volver a colocar los tapones en los reactivos inmediatamente. No intercambiar los tapones.

**Almacenamiento y estabilidad:**

- 20 Almacenar el kit sin abrir a 2-8°C tras su recepción y cuando no esté en uso, hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del kit. Obsérvese la etiqueta del paquete para la fecha de caducidad.  
  
Manténgase la placa de microtitulación en una bolsa cerrada herméticamente con desecante para minimizar su exposición al aire húmedo.  
  
Debe desecharse cualquier producto no cerrado herméticamente.
- 25 El kit de ensayo es estable hasta su fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del kit cuando se almacena a 2 - 8°C. Las pruebas de estabilidad a temperaturas aceleradas sugieren que el kit de ensayo es estable almacenado a temperaturas elevadas (25°C - 35°C) durante hasta dos semanas.  
  
Los dispositivos de tiras de microtitulación deben almacenarse en condiciones adecuadas (2-30°C; hasta su fecha de caducidad) para asegurar su funcionamiento adecuado.

**30 Recogida y preparación de especímenes**

- 35 Muestras de suero: La sangre completa debe recogerse usando técnicas de venipunción convencionales. Invertir el tubo varias veces para mezclar la sangre de manera adecuada. Los tubos de sangre deben almacenarse a temperatura ambiente durante al menos 2 horas, pero no más de 5 horas antes de centrifugar las muestras a 2.500 rpm durante 20 minutos a 40°C. Retirar el sobrenadante de suero y almacenar a 2-8°C durante hasta 48 horas.  
  
Almacenar a -20°C o menos para almacenamiento a largo plazo.  
  
Muestras de plasma: Debe usarse en el ensayo EDTA, heparina o citrato de plasma.  
  
Evítense las muestras hemolíticas (rojas) (después de la centrifugación). Se ha demostrado que las muestras hemolizadas dan resultados poco precisos.  
  
Los especímenes no deben volver congelarse y descongelarse repetidas veces antes del ensayo.
- 40 NO almacenar en congeladores que "no forman escacha", que pueden ocasionar descongelación ocasional. Deben centrifugarse antes de su uso los especímenes que se han congelado y aquellos que están turbios y/o contienen materia particulada.  
  
Evitar el contacto con la piel mediante el uso de guantes y vestimenta de laboratorio adecuada.

**Preparación del kit/reactivos**

- 45 Debe dejarse que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso, salvo para el

reactivo de concentrado de conjugado enzimático 250X. Mantener siempre el reactivo de concentrado de conjugado enzimático a 2-8 °C.

5 Preparación de la muestra: El suero de pacientes debe diluirse a 1:10 con diluyente de muestra antes de su uso. Preparar una serie de tubos pequeños (es decir, tubos de microcentrifugación de 1,5 ml) y añadir 15 µl de suero con 135 µl de diluyente de muestra.

#### Control de calidad

Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso diario de materiales de control para validar la fiabilidad del dispositivo de ensayo.

10 Si los valores de control no se encuentran dentro de los intervalos establecidos, los resultados del ensayo son inválidos.

#### Preparación del kit/reactivos

15 Reactivo de conjugado de trabajo: Para preparar el reactivo de conjugado de Hp de trabajo, diluir el concentrado de conjugado de enzima (250X) con el diluyente de conjugado enzimático. Añadir 0,004 ml de concentrado de conjugado enzimático (250X) a 1,0 ml de diluyente de conjugado. NO REUTILIZAR EL REACTIVO DE CONJUGADO ENZIMÁTICO DE TRABAJO. PREPARAR UNA DILUCIÓN RECIENTE ANTES DE CADA ENSAYO.

Tampón de lavado de trabajo: Preparación de tampón de lavado 1X a partir de solución madre 20X. Añadir 50 ml de solución madre de tampón de lavado 20X a 950 ml de agua desionizada. El tampón de lavado de trabajo es estable a 2-8 °C durante 30 días. NOTA: Cualquier cristal que pueda estar presente debido a elevadas concentraciones de sal debe volver a disolverse a temperatura ambiente antes de efectuar la dilución.

#### 20 Procedimiento de ensayo

NOTA: Recomendaciones de pipeteado (mono y multicanal): El pipeteo de todas las muestras y controles debe completarse en 15 minutos. Las muestras deben diluirse a 1:10 antes de su uso. Véase Preparaciones de reactivo de muestra. Fijar el número deseado de pocillos recubiertos en el soporte. Dispensar 100 µl de diluyente de muestra en el pocillo A1,B1 como control de fondo. Dispensar 100 µl de cada muestra de control positiva DILUIDA (1:10) por duplicado, una de cada del tercer al octavo pocillo (C1 a H1). Dispensar las muestras DILUIDAS en los pocillos adecuados. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C) en un agitador de placas configurado a aproximadamente 750 rpm. Retirar la mezcla de incubación sacudiendo los contenidos de la placa en un contenedor de desechos. Enjuagar los pocillos de microtitulación 5 veces con 300 µl de tampón de lavado de trabajo y sacudir. Golpear los pocillos sobre papel absorbente o toallas de papel para retirar las gotas de agua residuales. Administrar 100 µl de solución de conjugado de Hp de trabajo en cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C) en un agitador de placas configurado a aproximadamente 750 rpm. Retirar la mezcla de incubación sacudiendo los contenidos de la placa en un contenedor de desechos. Enjuagar los pocillos de microtitulación 5 veces con 300 µl de tampón de lavado de trabajo y sacudir. Golpear los pocillos sobre papel absorbente o toallas de papel para retirar las gotas de agua residuales. Administrar 100 µl de solución de TMB en cada pocillo. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C) en un agitador de placas configurado a aproximadamente 750 rpm. Detener la reacción añadiendo 100 µl de solución de paro a cada pocillo. Mezclar cuidadosamente durante 30 segundos. Es importante asegurarse de que el color azul vira completamente a color amarillo. Leer la absorbancia a 450 nm con un lector de pocillos de microtitulación en 15 minutos.

#### Interpretación de los resultados del ensayo

40 Comparar la absorbancia media de las muestras de control positivo (PC) con los intervalos del ensayo suministrados con cada kit en el certificado de análisis. La PC de Hp 1-1 debe encontrarse dentro del intervalo para las muestras de Hp 1-1, la PC de Hp 2-1 debe encontrarse dentro del intervalo para las muestras de Hp 2-1 y la PC de Hp 2-2 debe encontrarse dentro del intervalo para las muestras de Hp 2-2. Si cualquiera de las PC no se encuentran dentro del intervalo adecuado, es necesario repetir el ensayo.

45 El valor de corte para las muestras de Hp 2-2 se calcula multiplicando la lectura de DO del control de Hp 2-2 con el factor de ajuste de valor de corte indicado en el certificado de análisis. Por ejemplo: Factor de corte de Hp 2-2 = 0,6. D.O. de control de Hp 2-2 = 2,4. Valor de corte para Hp 2-2 = 2,4 x 0,6 = 1,44

En este ejemplo, cualquier muestra con lecturas de D.O. por encima de 1,44 es de fenotipo Hp 2-2. Cualquier muestra con una lectura por debajo de 1,44 no es de fenotipo Hp 2-2.

50 El cálculo anterior es únicamente con fines demostrativos. Cada operador debe determinar el valor de corte de Hp 2-2 para cada experimento.

Los factores de ajuste de valor de corte de Hp 2-2 se ajustan por el fabricante en cada lote de kits ejecutando al menos 50 muestras de cada fenotipo y determinando la sensibilidad y especificidad óptima usando gráficas de característica de funcionamiento de receptor (ROC). Deben repetirse las muestras cuyas lecturas de D.O. se

encuentren dentro de un 10% de un valor de corte. Las muestras cuyos resultados se encuentren de nuevo dentro de un 10% del valor de corte deben comunicarse como un resultado límite de Hp 2-2.

#### **Limitaciones del procedimiento**

5 No deben usarse las muestras de suero y plasma que demuestren hemólisis con el kit de ensayo. Se ha demostrado que las muestras hemolizadas dan resultados poco precisos.

No usar este ensayo para determinar el estado de Hp 2-2 en pacientes con mieloma múltiple.

Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando se lleve a cabo el procedimiento de ensayo según las instrucciones del prospecto y siguiendo buenas prácticas de laboratorio.

10 Los resultados obtenidos mediante el uso del kit de ensayo deben usarse como adjunto a otros procedimientos diagnósticos y la información disponible para el médico.

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente dará como resultado una precisión baja y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.

15 Las muestras de pacientes pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) que son capaces de proporcionar resultados falsamente elevados o reducidos en ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. Este ensayo se ha diseñado para minimizar la interferencia con especímenes que contengan HAMA. Sin embargo, no puede garantizarse la eliminación completa de esta interferencia de todos los especímenes de pacientes.

Se recomienda que los pocillos se lean en los 15 minutos posteriores a la adición de la solución de paro.

#### **Valores esperados**

20 El kit de ensayo es un ensayo cualitativo que identifica el fenotipo Hp 2-2 en suero o plasma humano como presente o ausente. La confirmación del fenotipo Hp 2-2 así como los resultados cuestionables deben confirmarse usando un método alternativo, preferentemente electroforesis en gel.

#### **Rendimiento de la prueba**

25 Precisión. Se determinó la variabilidad intra-ensayo o inter-ensayo (precisión) del kit de ensayo HAPTOCHECKTM en dos sitios probando 3 muestras de suero humano y un blanco de tampón. Las muestras se ensayaron 8 veces usando un solo lote de reactivos durante 10 días. Los datos de precisión se han proporcionado anteriormente.

**Listado de secuencias**

<110> RAPPAPORT FAMILY INSTITUTE FOR RESEARCH IN THE MEDICAL SCIENCES

5 <120> REACTIVOS Y MÉTODOS PARA DETECTAR UNA PROTEÍNA POLIMÓRFICA

<130> P-78517-EP

<140> EP 09763608.8

10 <141> 11-06-2009

<150> US 61/129.250

<151> 13-06-2008

15 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 409

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 1

25 agcctggaca tgatgtcctc tgctcagttc cttggtctcc tgttgctctg ttttcaaggt 60  
 agcagatgtg atatocagat gacacagact acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac 120  
 agagtcacca tcagttgcag ggcaagtcag gacattagga aatatttaa ctggtatcag 180  
 cagaaaccag atggaactgt taaactcctg atctactaca catcaagatt atattcggca 240  
 gtcccatcaa ggttcagtgg cagtgggtct ggaacagatt attctctcac cattagcaac 300  
 ctggaacaag aagatattgc catgtacttt tgtcaacaga gtgataggct tccttacacg 360  
 ttcggagggg ggaccaagct ggaaatcaaa cgtaagtcga ctgcaccaa 409

<210> 2

30 <211> 134

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 2

Ser Leu Asp Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Phe Gln Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala  
 35 40 45  
 Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp  
 50 55 60  
 35 Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Ala



ES 2 602 200 T3

```

65              70              75              80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
                85                90                95

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln
                100                105                110

Gln Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Lys
                115                120                125

Arg Lys Ser Thr Ala Pro
    130

<210> 3
<211> 11
5 <212> PRT
   <213> Ratón

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr Leu Asn
10  1              5              10

<210> 4
<211> 7
15 <212> PRT
   <213> Ratón

<400> 4

Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Ser
20  1              5

<210> 5
<211> 9
25 <212> PRT
   <213> Ratón

<400> 5

Gln Gln Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Thr
30  1              5

<210> 6
<211> 456
<212> ADN
<213> Ratón

35 <400> 6

tggccaatgt cctctccaca gtcctgaag aactgattc taaccatggg atggagctgg      60
atctttctct tcctcctgtc aggaactgca ggtgtccact cccaggttca gctgcagcag      120
tctggacctg agctgggtgaa gcctggggct tcagtgaagt tgcctgcaa ggcttctggc      180
tacaccttca taagttatga tataaactgg gtgaagcaga ggctggaca gggacttgag      240
tggattgggt ggatttatcc tagagatggt agtactaaat acaatgcaa cttcaagggc      300
agggccacat tgactgtgga cacctcctcc agcacagtgt atatggaaat ccacagcctg      360
acatctgagg actctgcggt ctatttctgt gcaagagacc ccgattacta cggtagtgtt      420
gactattggg gccaaggcac cactctcacc gtctctct                                456

```

ES 2 602 200 T3

<210> 7  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Ratón

5

<400> 7

Trp Pro Met Ser Ser Pro Gln Ser Leu Lys Thr Leu Ile Leu Thr Met  
 1 5 10 15

Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val  
 20 25 30

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
 35 40 45

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile  
 50 55 60

Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
 65 70 75 80

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Ala  
 85 90 95

Asn Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr  
 100 105 110

Val Tyr Met Glu Ile His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Cys  
 115 120 125

Ala Arg Asp Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 130 135 140

Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 145 150

10

<210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Ratón

15

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Ile Asn  
 1 5 10

20

<210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Ratón

25

<400> 9

Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Ala Asn Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 10  
<212> PRT  
<213> Ratón

5 <400> 10

Asp Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Val Asp Tyr  
1 5 10

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos una región variable de cadena ligera y al menos una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera: una CDRL 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y comprendiendo dicha región variable de cadena pesada: una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en donde dicho anticuerpo monoclonal tiene una afinidad de unión en orden decreciente para las isoformas de haptoglobina Hp 2-2; Hp 2-1; y Hp 1-1.
2. El anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se produce por el hibridoma murino depositado en la ATCC que tiene la denominación de depósito para patente PTA-9815.
3. El anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2; o
- que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7; o
- que comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7.
4. El anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina de las reivindicaciones 1 o 3, en donde dicha región variable de cadena ligera o de cadena pesada del anticuerpo ha sido al menos quimerizada, humanizada o se le han injertado CDR.
5. El anticuerpo anti-haptoglobina (Hp) de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende al menos un compuesto o polipéptido seleccionado entre un marcador o indicador detectable.
6. El anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) de la reivindicación 5, en donde el marcador detectable es una enzima; o
- en donde el marcador detectable es una enzima seleccionada entre peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.
7. Una composición que comprende
- el anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o
- una célula que comprende el anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o
- una línea celular empaquetadora que comprende el anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o
- una proteína recombinante que comprende el anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o
- una partícula vírica recombinante que comprende el anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina (Hp) o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
8. Un método para determinar un tipo de fenotipo de haptoglobina en un sujeto, que comprende:
- a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con un anticuerpo anti-haptoglobina o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, formando un complejo unido entre el anticuerpo anti-haptoglobina y la haptoglobina en la muestra biológica;
- b) determinar cuantitativamente una afinidad de unión entre dicha haptoglobina y dicho anticuerpo anti-haptoglobina; y
- c) comparar dicha afinidad de unión determinada cuantitativamente con un valor obtenido a partir de una afinidad de unión determinada cuantitativamente de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo a una isoforma Hp 1-1, Hp 2-1 o Hp 2-2 aislada, en donde la afinidad de unión determinada es indicativa del tipo de alelo de Hp, determinando de este modo el tipo de alelo de Hp en dicho sujeto.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la muestra biológica es suero o plasma; o

- en donde la muestra biológica es plasma y en donde el plasma se ha anticoagulado con citrato, heparina o EDTA; o
- que además comprende inmovilizar el complejo de anticuerpo anti-haptoglobina-antígeno sobre un sustrato; o
- 5 que además comprende inmovilizar el complejo anticuerpo anti-haptoglobina-antígeno sobre un sustrato, en donde la inmovilización comprende unir el anticuerpo anti-haptoglobina o el fragmento de unión a antígeno del mismo al sustrato; o
- 10 que además comprende (a) poner en contacto dicho complejo inmovilizado con una cantidad adicional de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo y (b) determinar una afinidad de unión entre dicho antígeno y dicha cantidad adicional de dicho anticuerpo anti-haptoglobina o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde el anticuerpo anti-haptoglobina es un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 o es el anticuerpo producido por el hibridoma murino depositado en la ATCC que tiene la denominación de depósito para patente PTA-9815.
- 20 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en donde la presencia de Hp 2-2 indica una mayor susceptibilidad a una complicación diabética; o
- 25 en donde la presencia de Hp 2-2 indica una mayor susceptibilidad a una complicación diabética seleccionada entre una enfermedad vascular, una neuropatía, una retinopatía, una enfermedad cardiovascular o una combinación de las mismas; o
- en donde dicho sujeto es diabético y en donde la presencia de Hp 2-2 indica un mayor potencial de beneficiarse de la reducción del estrés oxidativo o de una terapia antioxidante y reducir de este modo la incidencia de enfermedad cardiovascular.
- 30 12. El método de la reivindicación 11, en donde la enfermedad cardiovascular es insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad cardiovascular, ictus, infarto de miocardio, restenosis asociada a la angioplastia coronaria, retinopatía diabética, nefropatía diabética, menos vasos sanguíneos colaterales de la arteria coronaria o isquemia de miocardio; o
- en donde la reducción del estrés oxidativo se logra mediante terapia antioxidante; o
- 35 en donde la reducción del estrés oxidativo se logra mediante vitamina E o un análogo, metabolito o derivado de la misma.
13. Un kit que comprende un anticuerpo de captura e instrucciones para el uso de dicho anticuerpo para determinar el fenotipo de haptoglobina de un sujeto, en donde dicho anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40 14. El kit de la reivindicación 13, que además incluye instrucciones para correlacionar el fenotipo de haptoglobina con el riesgo de desarrollar una complicación diabética o con el beneficio de la reducción del estrés oxidativo o de la terapia antioxidante, en donde se inmoviliza dicho anticuerpo monoclonal; o
- que además comprende un anticuerpo de detección adicional, en donde dicho anticuerpo de detección es el mismo que el anticuerpo de captura.
- 45 15. Un nucleótido que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde la secuencia es la SEQ ID NO: 1 y un nucleótido que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde la secuencia es la SEQ ID NO: 6.