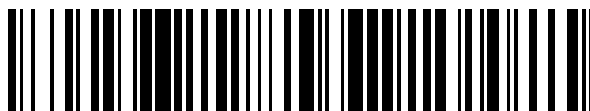


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 978**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012** **PCT/US2012/021315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012** **WO12097299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012** **E 12734706 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2663865**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales A1AT específicos para la detección de endometriosis**

30 Prioridad:

14.01.2011 US 201161433183 P

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

21.03.2019

73 Titular/es:

TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)

No. 250 Wu-Hsing Street

Taipei City, TW y

ACADEMIA SINICA (50.0%)

72 Inventor/es:

YANG, WEI-CHUNG;

WANG, HWEI-JIUNG;

CHEN, SHUI-TSUNG;

LU, KEN-FEN y

PENG, MING-CHI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 704 978 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

Anticuerpos monoclonales A1AT específicos para la detección de endometriosis

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere, en general, al diagnóstico y/o detección de endometriosis. Más particularmente, la presente divulgación está dirigida a anticuerpos monoclonales contra alfa 1-antitripsina (A1AT), células de hibridoma que producen la misma y sus usos en el diagnóstico y/o detección de endometriosis en una muestra biológica de un sujeto.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

La endometriosis es una enfermedad caracterizada por la presencia de tejido endometrial en los sitios ectópicos, tales como las glándulas y las células estromáticas del endometrio que deberían haber crecido dentro del útero, pero crecieron en sitios fuera del útero al tiempo que conservan la misma forma fisiológica de un endometrio normal.

20 Con frecuencia, la endometriosis no se descubre hasta que el paciente presenta dolor o fiebre durante el período menstrual, que luego se confirma mediante la inspección física de la cavidad abdominal del paciente. Dado que los síntomas de la endometriosis a menudo son pasados por alto por el paciente, el diagnóstico de la endometriosis a menudo se retrasa, lo que resulta en una situación más complicada. A pesar de que existen varios enfoques para diagnosticar la endometriosis, sin embargo, tienen una baja tasa de aceptación por parte del paciente o tienen una

25 sensibilidad limitada hacia ciertos tipos de endometriosis. Por ejemplo, la laparoscopia puede proporcionar un diagnóstico confiable de la endometriosis, pero su aceptación por parte del paciente es baja debido a los procedimientos invasivos involucrados. La técnica de imágenes de resonancia nuclear o ultrasonidos (MRI) vaginales ofrece mediciones sensibles a fibroides o quiste de chocolate de más de 2 cm, pero no es lo suficientemente sensible para detectar endometriosis. Se ha propuesto un biomarcador en suero, CA125, para

30 diagnosticar la endometriosis (Barbieri R. L, Fertil. Steril 45: 767-769, 1986), sin embargo, su sensibilidad a la endometriosis es un 15% baja.

La patente de EE.UU. No: 7,399,598, otorgada a Yang et al el 15 de julio de 2008, divulgó un método para diagnosticar la endometriosis en mujeres de 18 a 40 años al detectar el nivel de alfa 1-antitripsina (A1AT) y/o sus

35 fragmentos en la muestra de suero. Sin embargo, la detección se logró mediante análisis de inmunotransferencia convencional. Por lo tanto, existe en esta técnica la necesidad de un medio mejorado que tenga suficiente sensibilidad que permita la detección temprana de la endometriosis de una manera confiable.

B. Silvestrini et al. describen el desarrollo de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas con un anticuerpo monoclonal preparado contra alfa1-antitripsina para la detección diagnóstica de trastornos inflamatorios (Silvestrini et al: "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody prepared against alpha1-antitrypsin for diagnostic screening of inflammatory disorders", CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, vol. 36, no. 2, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 277-282, XP003026059, ISSN: 0009-9147), mientras que Elena Miranda et al. describen un anticuerpo monoclonal novedoso

45 para caracterizar polímeros patógenos en la enfermedad hepática asociada con la deficiencia de [alfa]-antitripson (Elena Miranda et al: "A novel monoclonal antibody to characterize pathogenic polymers in liver disease associated with [alpha] 1-antitrypsin deficiency, HEPATOLOGY, vol. 52, no. 3, 14 September 2010 (2010-09-14), pages 1078-1088, XP055134725, ISSN: 0270-9139; DOI: 10.1002/hep.23760). S. Janciauskiene divulga la detección de polímeros de células circulantes y endoteliales de Z y de tipo silvestre alfa 1-antitripsina por un anticuerpo monoclonal (S. Janciauskiene: "Detection of Circulating and Endothelial Cell Polymers of Z and Wild Type alpha 1-Antitrypsin by a Monoclonal Antibody", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 29, 22 May 2002 (2002-05-22), pages 26540-26546, XP055105655, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M203832200). El documento TW I 305 837 B se refiere a un método de diagnóstico no invasivo de la endometriosis mediante la detección de

50 marcadores bioquímicos en suero o líquido peritoneal o una combinación de ambos.

55 Resumen

Como se incorpora y se describe ampliamente en el presente documento, la divulgación en el presente documento presenta anticuerpos monoclonales contra alfa 1-antitripsina (A1AT), células de hibridoma que producen la misma y

60 sus usos en el diagnóstico y/o detección de endometriosis de una muestra biológica, tal como una muestra de suero de un sujeto.

Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se unen específicamente a un epítipo de una isoforma de A1AT.

65

Se proporcionan los anticuerpos monoclonales 2A7 y 2C8, que respectivamente se unen a AAT1 y AAT2. Ambos AAT1 y AAT2 son isoformas de A1AT, y respectivamente tienen un peso molecular de aproximadamente 72 y 58 kDa en una muestra biológica de un sujeto. El anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8 es reconocido por un epítipo de A1AT que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27. Los anticuerpos monoclonales 2A7 y 2C8 son respectivamente una IgG1.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, la muestra biológica puede ser una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de fluido peritoneal, o formas purificadas o filtradas de las mismas.

Los anticuerpos monoclonales como se describió anteriormente se pueden producir por hibridomas.

En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona usos de los anticuerpos monoclonales como se describió anteriormente, que incluyen métodos y/o kits para detectar endometriosis desde una muestra biológica de un sujeto.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona un método para diagnosticar endometriosis utilizando el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación. El método incluye las etapas de: poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo monoclonal que es 2A7 o 2C8; y detectar la unión respectiva del anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8 con AAT1 y AAT2; en el que el anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8 es reconocido por un epítipo de A1AT que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y AAT1 y AAT2 respectivamente tienen un peso molecular de aproximadamente 72 y 58 kDa en la muestra biológica.

La muestra biológica es una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de fluido peritoneal, o formas purificadas o filtradas de las mismas. En un ejemplo preferido, la muestra biológica es la muestra de suero.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan kits de diagnóstico para detectar endometriosis a partir de una muestra biológica de un sujeto.

De acuerdo con una realización, el kit incluye por lo menos uno de los anticuerpos monoclonales de esta invención y por lo menos un agente adecuado para detectar la unión respectiva de los anticuerpos monoclonales 2A7 o 2C8 con AAT1 y AAT2 en la muestra biológica del sujeto; en el que el anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8 se puede reconocer por un epítipo de A1AT que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y las isoformas A1AT de AAT1 y AAT2 respectivamente tienen un peso molecular de aproximadamente 72 y 58 kDa.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La presente descripción se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada que se lee a la luz de los dibujos adjuntos, en los que

La Figura 1 ilustra el análisis de transferencia Western del A1AT aislado de mujeres sanas o mujeres que tienen endometriosis, en el que el A1AT se ha tratado previamente con o sin una enzima de digestión con N-glicano, PNGasa F, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, en la que C representa el control y Endo representa las proteínas en suero de mujeres que tienen endometriosis;

La Figura 2 ilustra la medida cuantitativa de la intensidad del punto que representa la expresión de A1AT según se mide en los sujetos mediante análisis de transferencia puntual inmunitario utilizando el anticuerpo monoclonal (A) 2C8 o (B) 2A7 del Ejemplo 2, los sujetos se clasificaron en 5 grupos diferentes, en los que el control representa 28 mujeres sin endometriosis; Endo(+)GnRh(-)I-II representa 89 mujeres que tienen estadio leve de endometriosis; Endo(+)GnRh(-)III-IV representa 16 mujeres que tienen etapa grave de endometriosis; Adenomiosis representa 23 mujeres que tienen endometriosis que migra al peritoneo; y Endo(+)GnRh(+) representa 59 mujeres que tienen endometriosis y se han tratado con GnRh, *representa estadísticamente significativo (valor $P < 0.05$); y

La Figura 3 ilustra la medida cuantitativa de la intensidad del punto que representa la expresión de A1AT según se mide en los sujetos mediante análisis de transferencia de punto inmune utilizando CA125 como un indicador, en el que el control representa 25 mujeres sin endometriosis; Endo(+)GnRh(-)I-II representa 81 mujeres que tienen estadio leve de endometriosis; Endo(+)GnRh(-)III-IV representa 16 mujeres que tienen etapa grave de endometriosis; Adenomiosis representa 22 mujeres que tienen endometriosis que migra al peritoneo; y Endo(+)GnRh(+) representa 54 mujeres que tienen endometriosis y se han tratado con GnRh; y *representa estadísticamente significativo (valor $P < 0.05$);

La Figura 4A y 4B ilustran el nivel de AAT2 respectivamente detectado por los anticuerpos monoclonales 2C8 (A) y 2A7 (B) en muestras de suero recolectadas de mujeres con endometriosis tratadas con GnRh; y

La Figura 4C ilustra el nivel de AAT2 detectado por el anticuerpo monoclonal 2C8 en muestras de suero recolectadas de adenomiosis en mujeres tratadas con GnRh;

La Figura 5 ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal 2A7 hacia los péptidos A1AT sintéticos del Ejemplo 6.1 de acuerdo con una realización de esta invención, en la que A1AT (0.5 µg) y el estándar de proteína N (1 µg) se incluyeron como el estándar;

La Figura 6 ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal 2C8 hacia los péptidos A1AT sintéticos del Ejemplo 6.1 de acuerdo con una realización de esta invención, en la que A1AT (0.5 µg) y el estándar de proteína N (1 µg) se incluyeron como el estándar;

La Figura 7 ilustra la unión competitiva del anticuerpo monoclonal 2A7 entre A1AT y el péptido sintético 3, 14 o 21 de acuerdo con una realización de esta invención, en el que la relación molar de A1AT: anticuerpo monoclonal 2A7: el péptido sintético fue 1:0.5:1, 1:0.5:2, 1:0.5:3, 1:0.5:5, 1:0.5:10, 1:0.5:20, 1:0.5:50 y 1:0.5:100, respectivamente;

La Figura 8 ilustra la unión competitiva del anticuerpo monoclonal 2C8 entre A1AT y el péptido sintético 3, 14 o 21 de acuerdo con una realización de esta invención, en el que la relación molar de A1AT: anticuerpo monoclonal 2A7: el péptido sintético fue 1:0.5:1, 1:0.5:2, 1:0.5:3, 1:0.5:5, 1:0.5:10, 1:0.5:20, 1:0.5:50 y 1:0.5:100, respectivamente;

La Figura 9 ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal 2A7 hacia los péptidos A1AT sintéticos, que incluyen P-3, P-21 y P-27 en dosis de 1, 5, 10 o 20 µg de acuerdo con una realización de esta invención, en la que se utiliza PBS como un control; y

La Figura 10 ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal 2C8 hacia los péptidos A1AT sintéticos, que incluyen P-3, P-21 y P-27 en dosis de 1, 5, 10 o 20 µg de acuerdo con una realización de esta invención, en la que se utiliza PBS como un control.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La descripción detallada proporcionada a continuación en relación con los dibujos adjuntos se entiende como una descripción de los presentes ejemplos y no pretende representar las únicas formas en que se puede construir o utilizar el presente ejemplo. La descripción establece las funciones de los ejemplos y la secuencia de etapas para construir y operar los ejemplos. Sin embargo, las funciones y secuencias iguales o equivalentes se pueden lograr mediante diferentes ejemplos.

Los términos “un”, “una” y “el” como se utilizan en el presente documento se definen como “uno o más” e incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “anticuerpo” o “anticuerpos” como se utiliza en este documento es un término reconocido en la técnica y se entiende que se refiere a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicas activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une de forma inmunitaria específica a un antígeno. La inmunoglobulina de acuerdo con esta divulgación puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de moléculas de inmunoglobulina.

El término “anticuerpo monoclonal” está bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un único clon que reconoce solo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se producen normalmente mediante la fusión de una célula B que produce anticuerpos, normalmente de vida corta, con una célula de rápido crecimiento, tal como una célula inmortal. La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

Las prácticas de esta invención se describen a continuación en detalle con respecto a los anticuerpos monoclonales contra alfa 1-antitripsina (A1AT), las células de hibridoma que producen el mismo y sus usos en el diagnóstico y/o detección de endometriosis de una muestra biológica, tal como una muestra de suero, de un sujeto.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a isoformas de A1AT. De acuerdo con una realización, las isoformas de A1AT se pueden preparar al digerir A1AT con una endoglicosidasa para eliminar las cadenas de N-glicano de la A1AT. La endoglicosidasa es una enzima que libera oligosacáridos de las glucoproteínas, o simplemente divide cadenas de polisacáridos entre residuos que no son el residuo terminal. La endoglicosidasa adecuada incluye, pero no se limita a, endoglicosidasa D, F, F1, F2, G o H. En un ejemplo, se utilizó PNGasa F para liberar las cadenas de N-glicano de A1AT. De acuerdo con una realización preferida, se proporcionan dos isoformas de A1AT que tienen respectivamente un peso

molecular de aproximadamente 72 y 58 kDa. Las dos isoformas de A1AT que tienen respectivamente un peso molecular de aproximadamente 72 kDa y 58 kDa se denominan en lo sucesivo "AAT1" y "AAT2", y se utilizan como antígenos para unir anticuerpos monoclonales contra A1AT, o para detectar y/o diagnosticar endometriosis a partir de una muestra biológica de un sujeto.

Para producir los anticuerpos monoclonales deseados, los animales tales como ratones, ratas o conejos se inmunizan primero con A1AT en una forma adecuada. Generalmente, el adyuvante y la solución de A1AT se mezclan entre sí cuando se inmunizan los animales con A1AT. Los ejemplos de adyuvantes útiles para esta invención incluyen el adyuvante completo de Freund (FCA), el adyuvante incompleto de Freund (FIA) y el adyuvante de hidróxido de aluminio. La inmunización generalmente se lleva a cabo principalmente por inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular del antígeno. El intervalo de inmunización no está particularmente limitado. La inmunización se puede llevar a cabo a intervalos de varios días a varias semanas, preferiblemente de 2 a 3 semanas, de 1 a 10 veces, preferiblemente de 2 a 5 veces. Una vez que los títulos de anticuerpos alcanzan 2 o más en el nivel de absorbancia como resultado de la inmunización, los animales se dejan durante 2 a 6 meses, preferiblemente de 4 a 6 meses, más preferiblemente 6 meses, hasta que los títulos de anticuerpos hayan disminuido a 0.05-1, preferiblemente 0.05-0.5, más preferiblemente 0.05, en el nivel de absorbancia.

Luego, la reinmunización se lleva a cabo una pluralidad de veces, preferiblemente de 2 a 5 veces, a intervalos de varias semanas. Varios días, preferiblemente de 3 a 5 días, después de la inmunización final, se extraen las células esplénicas y los ganglios linfáticos regionales. Las muestras de sangre se toman regularmente después de la inmunización y se someten a centrifugación para separar los sueros. Los sueros resultantes se someten luego a la medición de los títulos de anticuerpos por cualquier método adecuado, que incluye, y no se limita a, ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA) o radioinmunoensayo (RIA). En un ejemplo preferido, los títulos de anticuerpos se miden por ELISA. Luego, se administra la inmunización final a aquellos animales que muestran altos títulos de anticuerpos frente a las isoformas A1AT preparadas por las etapas descritas anteriormente.

Las células productoras de anticuerpos se preparan a partir de células esplénicas y ganglios linfáticos regionales o similares de los animales inmunizados. En la preparación de células productoras de anticuerpos, es preferible eliminar los restos de tejido y los eritrocitos tanto como sea posible. El eliminador de eritrocitos comercial se puede utilizar para este propósito. Alternativamente, se pueden preparar y utilizar un tampón de cloruro de amonio y Tris.

Las células productoras de anticuerpos preparadas de este modo se deben fusionar inmediatamente con células inmortales, tales como las células de mieloma, para producir células de hibridoma, que continúan proliferando de manera semi-eterna mientras que producen anticuerpos. Se puede utilizar la cepa celular comúnmente disponible derivada de un animal como el ratón. Una cepa celular preferible para utilizar en esta invención no debería sobrevivir en el medio de selección de HAT, que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina, y debería sobrevivir allí solo cuando se fusiona con células productoras de anticuerpos. Ejemplos de células de mieloma incluyen, entre otros, estirpe celular de mieloma de ratón (tal como las células FO de mieloma) y estirpe celular de mieloma humano (tal como Karpas 707H).

La fusión celular generalmente se lleva a cabo al mezclar células esplénicas o células de ganglios linfáticos con células de mieloma disponibles en el mercado en presencia de un promotor de fusión celular, tal como polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 200 a 20.000 daltons o similares. Alternativamente, la fusión celular se puede llevar a cabo en un dispositivo de fusión celular comercial que utiliza estimulación eléctrica tal como electroporación. Después de la fusión, las células resultantes luego se diluyen y se cultivan en medio HAT.

Los hibridomas de interés luego se seleccionan a partir de las células fusionadas. Las células fusionadas que sobrevivieron cultivadas en medio HAT formarían colonias. Luego se recoge el sobrenadante de cada pozo de cultivo y se examina la presencia o ausencia de títulos de anticuerpos para AAT1 o AAT2 (es decir, isoformas de A1AT preparadas mediante las etapas descritas anteriormente). Como método de confirmación, se puede utilizar ELISA, EIA o RIA. Una vez que se identifican los pozos con anticuerpos positivos, las células luego se cultivan en un medio HT, que no contiene aminopterina. Después de cultivar durante un tiempo, se confirman de nuevo los títulos de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo. Las células que finalmente se seleccionan luego se someten a clonación para obtener celdas individuales. Los clones que muestran una alta especificidad para AAT1 o AAT2 se seleccionan y se proliferan en cierta medida para establecer hibridomas.

Para producir los anticuerpos monoclonales deseados, se seleccionaron tres hibridomas. Los dos hibridomas, respectivamente, producen anticuerpos monoclonales 2A7 y 2C8, que se unen respectivamente a AAT1 y AAT2.

Los anticuerpos monoclonales producidos de este modo se pueden aislar o preparar mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos a partir de sobrenadante cultivado obtenido al cultivar hibridomas en un medio con baja concentración de suero. Alternativamente, los hibridomas se pueden inyectar en las cavidades abdominales de los animales y se recogen los dropsies abdominales resultantes para preparar anticuerpos. Los anticuerpos se pueden purificar o aislar mediante métodos que emplean columna de afinidad,

cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico o similares. Cualquiera de estos métodos conocidos se puede seleccionar o utilizar en combinación apropiadamente.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal producido por la sepa seleccionada se une específicamente a AAT1 (es decir, una isoforma A1AT que tiene un peso molecular de aproximadamente 72 kDa). El anticuerpo monoclonal producido de esta manera es un IgG1 y se denomina "2A7" en lo sucesivo.

De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal producido por la sepa seleccionada se une específicamente a AAT2 (es decir, una isoforma A1AT que tiene un peso molecular de aproximadamente 58 kDa). El anticuerpo monoclonal producido de esta manera es un IgG1 y se denomina "2C8" en lo sucesivo.

Dado que se puede utilizar AAT1 y AAT2 como biomarcadores para detectar y/o diagnosticar endometriosis de un sujeto; los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación por lo tanto se pueden utilizar en un método o ensamblar en kits, para detectar endometriosis de una muestra biológica, tal como, una muestra de suero o una muestra de frotis, del sujeto.

De acuerdo con una realización de esta invención, es posible detectar endometriosis al hacer reaccionar cualquiera de los anticuerpos monoclonales con una muestra biológica para de esta manera medir cualquiera de las isoformas A1AT (es decir, AAT1 o AAT2) en la muestra biológica y utilizando el resultado medido como un indicador. La medición se puede realizar mediante cualquiera de los inmunoensayos convencionales y no está particularmente limitada.

Para este propósito, se toman muestras biológicas de sujetos sospechosos de endometriosis o sujetos de examen de salud. La muestra biológica puede ser cualquiera de una muestra de frotis, una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina, un fluido peritoneal, o formas purificadas o filtradas de las mismas. Desde el punto de vista de la detección temprana, se prefiere una muestra de sangre, suero o plasma. Las muestras biológicas preparadas de esta manera se hacen reaccionar con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de esta divulgación. La medición de la endometriosis o la medición del nivel de AAT1 y AAT2 en la muestra biológica se puede realizar mediante ELISA convencional o análisis de transferencia de puntos.

De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, es posible utilizar el anticuerpo monoclonal contra cualquier isoforma A1AT tal como AAT1 o AAT2 en un kit de detección de endometriosis o como reactivo para la detección de AAT1 o AAT2.

De esta manera los inventores han contemplado un kit de detección AAT1 o AAT2, que es capaz de medir el nivel respectivo de AAT1 y AAT2 en una muestra biológica con alta sensibilidad. El kit de la presente invención incluye por lo menos uno de los anticuerpos monoclonales seleccionados del grupo que consiste de 2A7 y 2C8 y por lo menos un agente adecuado para detectar la unión respectiva de 2A7 y 2C8 con AAT1 y AAT2 en la muestra biológica del sujeto. La muestra biológica descrita en este documento incluye, pero no se limita a, una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de plasma, y formas purificadas o filtradas de las mismas. Los componentes incluidos en los kits son: un recipiente; los anticuerpos monoclonales 2A7 o 2C8 y reactivos para detectar una muestra biológica. Adicionalmente, una leyenda se puede asociar con el contenedor que indica cómo utilizar los anticuerpos monoclonales para detectar A1AT en la muestra biológica. La leyenda puede estar en forma de folleto, cinta, CD, VCD o DVD. El kit puede comprender adicionalmente un control negativo que indica el nivel normal de A1AT en un sujeto.

Para determinar el(los) epítipo(s) de A1AT reconocido por el anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8 de esta invención, la longitud completa del polipéptido maduro A1AT que tiene 418 aminoácidos de longitud se divide en 26 fragmentos consecutivamente, con residuos de aminoácidos superpuestos en cada fragmento. Cada fragmento de péptido contiene aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de A1AT humano. El péptido derivado de A1AT se puede sintetizar de acuerdo con cualquier protocolo de síntesis de péptidos estándar en la técnica. Por ejemplo, los péptidos derivados de A1AT se sintetizaron mediante el uso de un sintetizador de péptidos en fase sólida (sintetizador de péptidos ABI433A, Applied Biosystems Inc., Life Technologies Corp., Foster City, CA, EE.UU.) De acuerdo con los protocolos del fabricante. Los péptidos sintéticos se designaron P-1 (SEQ ID NO: 1), P-2 (SEQ ID NO: 2), P-3 (SEQ ID NO: 3), P-4 (SEQ ID NO: 4), P-5 (SEQ ID NO: 5), P-6 (SEQ ID NO: 6), P-7 (SEQ ID NO: 7), P-8 (SEQ ID NO: 8), P-9 (SEQ ID NO: 9), P-10 (SEQ ID NO: 10), P-11 (SEQ ID NO: 11), P-12 (SEQ ID NO: 12), P-13 (SEQ ID NO: 13), P-14 (SEQ ID NO: 14), P-15 (SEQ ID NO: 15), P-16 (SEQ ID NO: 16), P-17 (SEQ ID NO: 17), P-18 (SEQ ID NO: 18), P-19 (SEQ ID NO: 19), P-20 (SEQ ID NO: 20), P-21 (SEQ ID NO: 21), P-22 (SEQ ID NO: 22), P-23 (SEQ ID NO: 23), P-24 (SEQ ID NO: 24), P-25 (SEQ ID NO: 25) y P-26 (SEQ ID NO: 26); y se describen en detalle en la Tabla 1 en un ejemplo preferido.

Cualquier experto en esta técnica puede modificar los péptidos sintetizados mediante métodos (como un programa de simulación por ordenador) que predicen el efecto sobre la conformación del polipéptido de un cambio en la secuencia de polipéptidos y, por lo tanto, se puede “diseñar” o “modificar” un péptido derivado de A1AT con base en la información divulgada en el presente documento al proponer y probar un péptido derivado de A1AT modificado para determinar si el péptido derivado de A1AT modificado retiene una función o conformación deseada. El péptido derivado de A1AT se puede modificar específicamente para alterar una característica del péptido no relacionada con su actividad fisiológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína se pueden sustituir o eliminar para evitar el enlace disulfuro no deseado. De manera similar, ciertos aminoácidos se pueden modificar y/o eliminar sin afectar la actividad fisiológica del péptido en este estudio (es decir, su capacidad para unirse al anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8 en un inmunoensayo). Esta invención abarca, por lo tanto, derivados funcionalmente equivalentes de péptidos derivados de A1AT sintetizados en una realización de esta invención, incluyendo péptidos que tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; (g) E, D; y (h) C, M.

De acuerdo con una realización específica de esta invención, los péptidos derivados de A1AT y el A1AT de longitud completa están sujetos a una unión competitiva con el anticuerpo monoclonal 2A7 o 2C8, para determinar el péptido derivado de A1AT (es decir, el epítipo de A1AT) que puede ser reconocido Por el anticuerpo monoclonal de esta invención. La unión del anticuerpo se puede detectar mediante técnicas conocidas en el arte, como el radioinmunoensayo, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el inmunoensayo “intercalado”, los inmunoensayos in situ (por ejemplo, utilizando marcadores coloidales de oro, enzimas o radioisótopos), transferencia de Western, ensayo de aglutinación (por ejemplo, ensayo de aglutinación en gel, ensayo de hemaglutinación y etc.), ensayo de fijación del complemento, ensayo de inmunofluorescencia y ensayo de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, la unión del anticuerpo se detecta mediante el uso de ELISA. Ambos anticuerpos monoclonales 2A7 y 2C8 son reconocidos por el péptido derivado de A1AT, particularmente, el péptido P-3 sintético A1AT (SEQ ID NO: 3).

De acuerdo con la presente invención, el péptido A1AT sintetizado tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27. El porcentaje de identidad es una medida del número de residuos de aminoácidos idénticos en una secuencia lineal ininterrumpida de un polipéptido cuando se compara con una secuencia de polipéptido objetivo de longitud específica. Como se utiliza en este documento, “identidad” de una secuencia significa que los residuos de aminoácidos comparados en dos secuencias separadas son idénticos. Por lo tanto, 100% de identidad significa, por ejemplo, que, al comparar 20 residuos de aminoácidos secuenciales en dos moléculas diferentes, ambos 20 residuos en las dos moléculas diferentes son idénticos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención sin limitar, sin embargo, los mismos.

Ejemplos

Los anticuerpos monoclonales (mAbs), hibridomas para producir los mAbs y usos de los mismos de la presente divulgación se ilustrarán con más detalle con referencia a varios ejemplos a continuación, que no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1 Preparación de antígenos

Las muestras de suero se obtuvieron con el consentimiento informado de mujeres con endometriosis. Las muestras de suero se precipitaron mediante al agregar 4 veces el volumen de acetona fría que contenía ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). La mezcla se mantuvo a -20°C durante 90 min, luego se centrifugó a 4°C con una velocidad de 15.000 x g durante 20 min. El sedimento se recogió y se lavó con acetona enfriada con hielo, seguido de otra centrifugación a una velocidad de 15.000 x g durante 20 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se disolvió en tampón de rehidratación (urea 7M, CHAPS al 4% ([3-(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), tiourea 2M, azul de bromofenol al 0.002% y ditioeritritol al 65% mM DTE)).

Las proteínas en el tampón de rehidratación se trataron posteriormente con PNGasa F para eliminar cualquier cadena de N-glicano de las proteínas. Las proteínas digeridas luego se identificaron por transferencia de Western. Brevemente, se sometió a electroforesis una cantidad igual de muestras de proteína con SDS-PAGE al 10% y luego se transfirió a una membrana de PVDF (Minipore) utilizando el sistema semiseco Bio-Rad. La unión no específica se bloqueó con leche descremada al 5% en tampón TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 0.5 M y pH 8.0) durante una hora, luego se incubó la transferencia con anticuerpo α 1-antitripsina anti-humano (es decir, anticuerpo AAT704, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California) en TBS con leche descremada al 0.1% a 4°C durante la noche. Después de tres lavados de 10 minutos con tampón TBST (tampón TBS que contenía Tween-20 al 0.1%), la transferencia se empapó en una solución que contenía un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina o anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en una dilución apropiada en TBS con leche descremada al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo con tampón TBST y tampón TBS durante 10 min, la transferencia se

incubó con NBT/BCIP que interactuaba con AP o DAB/H₂O₂ que interactuaba con HRP para el desarrollo colorimétrico. El resultado se ilustra en la Figura 1.

La Figura 1 representa el análisis de transferencia Western de los antígenos de proteína aislados de mujeres que tienen endometriosis en presencia o ausencia de una enzima de digestión con N-glicano, PNGasa F, que elimina cualquier cadena N-glicano de las proteínas. Se identificaron dos isoformas de bandas de proteína A1AT a 72 y 58 kDa y se denominaron respectivamente AAT1 y AAT2.

Ejemplo 2 Producción de anticuerpos monoclonales

2.1 Inmunización de animales con alfa 1-antitripsina (A1AT) y medición de títulos de anticuerpos

Los ratones se inmunizaron con alfa 1-antitripsina (A1AT, adquirida de Sigma Inc) a una dosis de 30 µg/animal, 2 a 6 veces, en intervalos de 4 semanas. Después de 2 refuerzos, las muestras de sangre se tomaron cada semana y se centrifugaron inmediatamente para separar los sueros. Los sueros resultantes se sometieron a dilución en serie, seguido de la medición de los títulos de anticuerpos por transferencia de Western.

2.2 Preparación de células productoras de anticuerpos

Los animales con títulos deseados en el ejemplo 2.1 (es decir, cuando una dilución 1:5.000 de los sueros fueron positivos en transferencia de Western) se seleccionaron para una fusión. Las células productoras de anticuerpos se prepararon a partir de células esplénicas, nódulos linfáticos regionales de los animales inmunizados y los hibridomas se generaron mediante la fusión de las células que producen anticuerpos con una estirpe celular de mieloma FO de acuerdo con los procedimientos descritos por Hong et al (J Immunol Methods 120: 151-157 (1989)). Brevemente, se mezclaron 1x10⁶ células/ml de células esplénicas o células de ganglios linfáticos con 2x10⁶ células/ml de células de mieloma en medio PMI-1640 libre de suero en presencia de polietilenglicol (PEG), que tiene un peso molecular de aproximadamente 1.500 Da. Después de la fusión, las células híbridas resultantes luego se clonaron de la manera convencional, tal como utilizando una dilución limitada.

2.3 Establecimiento de Hibridomas.

10 -14 días después de la fusión celular, se permitió que las células seleccionadas de acuerdo con las etapas descritas en el ejemplo 2.2 formaran colonias. El sobrenadante en cada pozo positivo para colonias de la placa de cultivo se recogió y se examinó para determinar la presencia o ausencia de títulos de anticuerpos para AAT1 o AAT2 del Ejemplo 1 mediante ELISA. Una vez que se confirmaron los pozos positivos a anticuerpos, las células se transfirieron a placas de 24 o 12 pozos y el medio se reemplazó con medio HT (es decir, medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) que no contenía aminopterina).

Las células en los pozos finalmente seleccionados se sometieron luego a clonación para obtener células individuales. En resumen, las suspensiones celulares se diluyen con medio RPMI 1640 que contiene FCS al 20% y se siembran en placas de 96 pozos a aproximadamente 0.5-2 células/pozo. Cuanto menor sea el número de células sembradas en cada pozo de la placa de 96 pozos, mayor será la probabilidad de que se siembre una célula en un pozo. 7-10 días después de la siembra, se recolectó el sobrenadante de las placas de cultivo y se probaron sus títulos de anticuerpos. Nuevamente, se seleccionaron los clones que tenían una alta especificidad para AAT1 o AAT2 y una baja reactividad cruzada con AAT1 o AAT2, y proliferaron hasta cierto punto para formar hibridomas. En resumen, se seleccionaron y cultivaron tres clones que produjeron los anticuerpos monoclonales deseados, en los cuales dos clones produjeron anticuerpos que se unían específicamente a AAT2 con alta afinidad; y un clon produjo anticuerpos que se unían específicamente a AAT1 con alta afinidad.

2.4 Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales específicos de AAT1 o AAT2 se purificaron y prepararon a partir de los hibridomas establecidos del Ejemplo 2.3 mediante el método descrito a continuación. Se administraron aproximadamente 10⁶ a 10⁷ células de hibridoma a la cavidad abdominal de un ratón para expandir las células de hibridoma. Después de 1 a 2 semanas, la hidropesía abdominal de cada ratón se cosechó para recoger los anticuerpos monoclonales. La IgG obtenida se prepara mediante precipitación con (NH₄)₂SO₄ seguido de purificación de proteína G.

Los anticuerpos monoclonales producidos de esta manera con alta afinidad a AAT1 y AAT2, respectivamente, fueron isotipo IgG1 y se denominaron respectivamente 2C8 y 2A7.

Ejemplo 3 Detección de endometriosis utilizando anticuerpos monoclonales del ejemplo 2

La especificidad de los anticuerpos monoclonales 2A7 y 2C8 del Ejemplo 2 se analizó utilizando un análisis de transferencia puntual inmunitaria.

En este ejemplo, se obtuvieron muestras de suero de un total de 235 mujeres con consentimiento informado y se clasificaron en 5 grupos. El grupo de control estaba compuesto por 48 mujeres sin endometriosis en edad reproductiva. 89 mujeres con endometriosis pélvica en estadio leve (o temprano) y que no habían recibido tratamiento con hormona liberadora de gonadotropina (GnRh) se clasificaron como grupo Ecdo(+)GnRh(-)I/II. 16 mujeres con estadio severo de endometriosis pélvica y que no habían recibido tratamiento con GnRh se clasificaron como grupo Ecdo(+)GnRh(-)III/IV. 23 mujeres con adenomiosis se clasificaron como grupo de adenomiosis. Finalmente, 59 mujeres con endometriosis pélvica y que recibieron tratamiento con GnRh se clasificaron como grupo Endo(+)GnRh(+).

Para realizar el análisis de transferencia puntual, se transfirieron 5 ng de suero recolectado de las mujeres descritas anteriormente sobre una membrana de PVDF. Después de bloquear con leche descremada al 5% a 4°C durante la noche, la membrana de PVDF se incubó con anticuerpo monoclonal de ratón anti-A1AT (2A7 o 2C8 del Ejemplo 2) (dilución 1:1000) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavados extensos con tampón TBST, se agregó solución de DAB (10 ml de PBS, 0.5 ml de NiCl_2 , 10 μl de H_2O_2 y 0.2 mg de polvo de DAB) que contenía cromógeno para el desarrollo del color. La intensidad del punto reaccionado, que representa el nivel de A1AT se detecta por el anticuerpo A1AT indicado. Varias cantidades de A1AT también se transfirieron sobre la membrana como control interno. La intensidad del punto se cuantificó utilizando un software de procesamiento de imágenes (Scion, EE.UU.). Los resultados se ilustran en la Figura 2.

Como se muestra en la Figura 2, se observaron niveles significativos de isotipos A1AT en mujeres con endometriosis en estadio leve o grave, así como en mujeres con adenomiosis. La presencia de isotipos A1AT fue detectada y reconocida por los anticuerpos monoclonales 2C8 (Figura 2A) y 2A7 (Figura 2B) generados de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

Como una comparación, se probó otro biomarcador, CA125, para ver si era útil para la detección de la endometriosis. Como se muestra en la Figura 3, aunque las mujeres que tienen endometriosis en estadio severo o adenomiosis mostraron un alto nivel de CA125, aún la cantidad de CA125 en mujeres que tienen endometriosis en estadio leve no es significativamente diferente de ninguno de los controles, las mujeres que tenían endometriosis en estadio leve o mujeres que tenían endometriosis pélvica y tampoco en las que recibieron tratamiento con GnRh. Los resultados sugieren que, en comparación con los anticuerpos monoclonales de esta invención, CA125 es un biomarcador deficiente en términos de detección de endometriosis.

Ejemplo 4 Estudio comparativo sobre la eficacia de detección entre los anticuerpos monoclonales del ejemplo 2, CA125 y el anticuerpo A1AT conocido

Para verificar la sensibilidad, especificidad y/o precisión de los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2 en la detección temprana de la endometriosis, se sometieron a una prueba de unión como se describe en el Ejemplo 3, en comparación con CA125 y otro anticuerpo anti-A1AT disponible comercialmente (es decir, AAT704, obtenido de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.).

Se tomaron muestras de sangre con el consentimiento informado de 48 mujeres, que se clasificaron adicionalmente en 4 grupos según sus respectivos estadios de enfermedad, en los que el control representa a 8 mujeres sanas en edad reproductiva; Endo (I/II) representa 89 mujeres con endometrosis leve (estadio I o II); Endo (III/IV) representa a 16 mujeres con endometriosis severa (estadio III o IV); y AP representa a 50 mujeres con adenomiosis.

La sensibilidad y especificidad de cada anticuerpo para detectar el antígeno de la endometriosis, AAT1 o AAT2 del Ejemplo 1, en la muestra de suero se calculó con base en la determinación del nivel de corte a partir de la característica de operación del receptor (ROC) de cada ensayo de transferencia puntual. El área bajo la curva fue aproximadamente el porcentaje correctamente clasificado. El punto de corte sobre la curva ROC se determinó por el valor mínimo para $(1 \text{ sensibilidad})^{2+} (1 \text{ especificidad})^2$.

La Tabla 1 resume la sensibilidad, especificidad y precisión de los anticuerpos indicados, anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2, CA125 o AAT704, en el diagnóstico o detección de la presencia de antígeno de endometriosis en muestras de suero obtenidas de las mujeres descritas anteriormente.

La sensibilidad general de los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2 para detectar la endometriosis en todos los estadios fue mucho mayor que aquella en AAT704 o CA125. Con respecto a la sensibilidad, los anticuerpos 2C8 y 2A7 de la presente invención en todos los estadios fueron superiores al 90%; mientras que CA125 exhibió una sensibilidad baja del 20% para la endometriosis en estadio temprano, que luego aumentó a aproximadamente el 68% para la endometriosis en estadio severo. Por otro lado, AAT704, fue más sensible a la endometriosis en estadio temprano (más del 70%), que a la endometriosis en estadio severo (aproximadamente 13%). Con respecto a la especificidad, 2C8 y 2A7 mostraron una especificidad de por lo menos el 93% en todos los estadios de la endometriosis; mientras que la especificidad para CA125 y AAT704 fue de aproximadamente el 92% y 50-90%, respectivamente.

Tabla 1

Abs	Estadio de enfermedad	Corte(U)	AUC	Valor P^*	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
CA125	I, II	35	0.926	4.87335E-06	20.99	92.00	37.74
CA125	III, IV	35	0.785	0.016643999	68.75	92.00	82.93
A1AT(2C8)	I, II	17.158	0.967	2.06496E-19	86.52	93.75	89.78
A1AT(2C8)	III, IV	17.217	0.977	1.39022E-08	93.75	93.75	93.75
A1AT(2A7)	I, II	15.454	1	5.58569E-22	94.38	100.00	100
A1AT(2A7)	III, IV	13.473	0.992	4.61083E-09	93.75	95.83	95.31
AAT704	I, II	0.899	0.899	7.86079E-09	74.67	91.30	79.59
AAT704	III, IV	0.055	0.055	3.45168E-05	13.04	52.17	64.70

* Un valor de p con $p < 0.05$ indica que las diferencias entre cada grupo son significativas

5 Ejemplo 5 El nivel de isoformas A1AT detectadas por anticuerpos monoclonales del ejemplo 2 en muestras de suero obtenidas de mujeres con endometriosis tratadas con GnRh

10 En este ejemplo, los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2, 2C8 y 2A7, se utilizaron para detectar el nivel de AAT2 en muestras de suero recolectadas de mujeres con endometriosis después de haber sido tratadas con GnRh, para confirmar que las isoformas A1AT del Ejemplo 1 son realmente buenos indicadores para la aparición de la endometriosis. La unión de los anticuerpos monoclonales respectivos con una isoforma A1AT correspondiente se midió mediante un ensayo de transferencia puntual inmunitario de acuerdo con las etapas descritas en el Ejemplo 3. Los resultados se ilustran en la Figura 4.

15 Es claro a partir de la Figura 4A y 4B que los niveles de AAT2 en mujeres con endometriosis después de recibir el tratamiento con GnRh, ya sea detectado por el anticuerpo monoclonal 2C8 o 2A7 del Ejemplo 2, disminuyen significativamente, en comparación con aquellos de mujeres con endometriosis sin tratamiento con GnRh.

20 También se encontraron resultados similares en mujeres con adenomiosis, después de recibir el tratamiento con GnRh, los niveles en sueros de AAT2 en estas mujeres detectados por el anticuerpo monoclonal 2C8, disminuyeron significativamente, en comparación con aquellas sin tratamiento con GnRh (Figura 4C).

25 El hallazgo en este ejemplo confirma que por lo menos AAT2, la isoforma A1AT que tiene un peso molecular de 58 kDa identificado en el presente estudio, es un buen biomarcador para la aparición de endometriosis, y puede detectarse eficazmente por el anticuerpo monoclonal 2C8 o 2A7 de la presente divulgación.

Ejemplo 6 Mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales del ejemplo 2

6.1 Preparación de péptidos A1AT sintéticos

30 Con el fin de definir el(los) epítomo(s) de A1AT reconocido(s) por los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2, A1AT se dividió en 26 fragmentos de péptidos, que se prepararon mediante el uso de un sintetizador automático de péptidos en fase sólida (sintetizador de péptidos ABI433A, Applied Biosystems Inc., Life Technologies Corp., Foster City, CA, EE.UU.). Para preparar estos péptidos se utilizaron procedimientos estándar de la química de N^α-9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). La secuencia primaria de cada péptido se proporciona en la TABLA 2.

35 Todos los péptidos A1AT sintéticos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) con una columna de octadecil semipreparativa (C₁₈). La fase móvil en la RP-HPLC es un sistema de solvente acetonitrilo/agua que contiene ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%. La detección se realizó a una longitud de onda de 220 nm y los picos se registraron y cuantificaron. Se recogió el eluado de cada serie de purificación y se agruparon las fracciones con componentes idénticos y luego se recuperaron mediante liofilización en condiciones de vacío. La pureza final de cada péptido recolectado se determinó mediante RP-HPLC analítica y se logró una pureza del 95% o superior. Los péptidos sintéticos se mantuvieron congelados a -20°C hasta uso.

45 Los péptidos sintéticos A1AT purificados se caracterizaron adicionalmente por sus pesos moleculares por espectroscopia de masas de ionización por electrospray (ESI-MS).

Tabla 2 Los péptidos A1AT sintéticos

Número de péptido	No. de Residuo A1AT	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No
1	25-44	H ₂ N- EDPQGDAQAQKTDTSHHDDQDH-COOH	1
2	39-59	H ₂ N-HDQDHPTFNKLTNLAFAF-COOH	2
3	55-74	H ₂ N-AEFAFSLYRQLAHQSNSTNI-COOH	3
4	70-99	H ₂ N-NSTNIFFSPVSIATAFAMLS-COOH	4
5	86-105	H ₂ N-FAMLSLGTKADTHDEILEGL-COOH	5
6	101-120	H ₂ N-ILEGLNFNLTELPEAQLHEG-COOH	6
7	116-135	H ₂ N-QIHEGFQELLRTLNPDSQL-COOH	7
8	131-150	H ₂ N-PDSQLQLTTGNGLFLSEGLK-COOH	8
9	146-165	H ₂ N-SEGLKLVDFLEDVKKLYHS-COOH	9
10	161-180	H ₂ N-KLYHSEAFTVNFGDTEEAKK-COOH	10
11	176-195	H ₂ N-EEAKKQINDYVEKGTQGGKIV-COOH	11
12	191-210	H ₂ N-QGKIVDLVKELDRDVFALV-COOH	12
13	206-215	H ₂ N-VFALVNYIFFKKGKWEREV-COOH	13
14	221-240	H ₂ N-RPFVKDTEEDFHVDEQVTT-COOH	14
15	236-255	H ₂ N-DQVTTVKVPMMLGGMFNIQ-COOH	15
16	251-270	H ₂ N-MFNIQHCKKLSSWVLLMSKYL-COOH	16
17	266-285	H ₂ N-LMKYLGNATAIFFLPDEGKL-COOH	17
18	281-300	H ₂ N-DEGKLQHLENELTHDIITKF-COOH	18
19	296-315	H ₂ N-IITKFLENEDRRSASLHLPK-COOH	19
20	311-330	H ₂ N-LHLPKLSITGTVDLKSVLGQ-COOH	20
21	326-345	H ₂ N-SVLGQLGITVFSNGADLSG-COOH	21
22	341-360	H ₂ N-ADLSGVTEEAPLKLSKAVHK-COOH	22
23	356-375	H ₂ N-KAVHKAVLTIDEKGTEAAGA-COOH	23
24	371-395	H ₂ N-EAAGAMFLEAIPMSIPPEVK-COOH	24
25	391-405	H ₂ N-PPEVKFNKPFVFLMIEQNTK-COOH	25
26	401-418	H ₂ N-EQNTKSPFLFMGKVVNPTQK-COOH	26

6.2 Mapeo de epítopos por transferencia puntual

En este ejemplo, se utilizó el método de transferencia puntual para identificar el(los) epítipo(s) de A1AT reconocido por cualquiera de los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2. Brevemente, los péptidos A1AT sintéticos del Ejemplo 6.1 se mancharon respectivamente en una membrana de nitrocelulosa (10 µg/punto), se permitió que la membrana se secase y luego bloqueara los sitios no específicos al empapar la membrana en BSA al 5% en solución de TBS-T (Tween 20 en TBS al 0.05%, que incluye Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) a temperatura ambiente durante 0.5 a 1 hora. Se incubaron los puntos con los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 2 (dilución 1:1.000) a temperatura ambiente durante por lo menos 30 minutos. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T. Se aplicaron anticuerpos secundarios (es decir, IgG anti-ratón de cabra) conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:3.000) en cada punto y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y una vez con TBS. Se aplicó el reactivo ECL a cada punto durante 1 minuto y se expuso la película de rayos X en el cuarto oscuro. Se compararon las señales de cada punto con aquella de un estándar. Se utilizaron dos estándares en este estudio, que fueron estándar de A1AT (0.5 µg) y de proteína N (1 µg), respectivamente. Los resultados se ilustran en las Figuras 5 y 6.

Como se representa en la Figura 5, el anticuerpo monoclonal 2A7 exhibió 1-2 veces la reactividad hacia los péptidos 10, 11, 18 o 24, y más de 2 veces la reactividad con los péptidos 3, 5, 9, 12, 14, 21 y 26, respectivamente. De manera similar, el anticuerpo monoclonal 2C8 exhibió 1-2 veces la reactividad con los péptidos 3, 10, 11 o 18; y más de 2 veces la reactividad con los péptidos 5, 9, 12, 14, 21 o 26 (Figura 6).

6.3 Mapeo de epítopos por ELISA competitivo

Se seleccionaron los péptidos 3, 14 y 21 del Ejemplo 6.2 y se realizó un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima competitivo (ELISA) para la determinación del epítipo de A1AT reconocido por el anticuerpo monoclonal del Ejemplo 2. Brevemente, en una placa de 96 pozos, se mezclaron varias concentraciones de anticuerpo monoclonal del Ejemplo 2 (2A7 o 2C8) con los péptidos 3, 14 o 21, y se les permitió formar un complejo a 4°C, luego se lavó el complejo con solución de PBS 3 veces. Se aplicó el anticuerpo secundario (es decir, IgG anti-ratón de conejo) conjugado con HRP y se incubó adicionalmente la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa 3 veces con PBS, luego se agregó una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) a cada pozo, lo que permitió que la mezcla se incubara a 37°C durante 15 minutos, mientras se protegía de la luz. Se agregó una solución de parada (es decir, HCl 0.1 N) a cada pozo y se ejecuta un lector de microplacas para tomar medidas a

450 nm. La relación molar de A1AT: anticuerpo monoclonal del Ejemplo 2: péptido fue aproximadamente 1:0.5:1, 1:0.5:2, 1:0.5:3, 1:0.5:5, 1:0.5:10, 1:0.5:20, 1:0.5:50 y 1:0.5:100, respectivamente. Los resultados se ilustran en las Figuras 7 y 8.

5 Como se representa en las Figuras 7 y 8, el péptido 3 es capaz de competir con A1AT por el anticuerpo monoclonal del ejemplo 2, con su capacidad de unión disminuida junto con un aumento en la concentración de péptido. Los resultados indicaron que tanto el 2A7 como el 2C8 pueden reconocer el mismo epítipo de A1AT representado por el péptido 3.

10 6.4 El péptido derivado del péptido 3

En vista de los resultados del ejemplo 6.3, un péptido más pequeño (es decir, el péptido 27 o P-27) que tiene solo 10 residuos de aminoácidos, es decir, H₂N-SLYRQLAHQS-COOH (SEQ ID No: 27 que corresponde a los residuos de aminoácidos 60-69 de A1AT), se diseñó en función de la secuencia del Péptido 3 y se sometió adicionalmente a un
15 ensayo de transferencia puntual como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en las Figuras 9 y 10. Como se representa en la Figura 9, este péptido (P-27) pudo reaccionar con el anticuerpo monoclonal 2A7 de esta invención, con su reactividad que aumenta aproximadamente 2 veces, en comparación con aquella del control. También se encontraron resultados similares para el anticuerpo monoclonal 2C8 de esta invención, la reactividad aumenta aproximadamente 1 vez, en comparación con aquella del control (Figura 10).

20 Listado de secuencias

<110> Taipei Medical University
Academia Sinica
25 Yang, Wei-Chung
Wang, Hwei-Jiung
Chen, Shui-Tsung
Lu, Ken-Fen
Peng, Ming-Chi

30 <120> Anticuerpos monoclonales A1AT específicos para la detección de endometriosis

<130> P2676-PCT

35 <160> 27

<170> PatentIn version 3.5

40 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> péptido sintético

<400> 1
Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His
1 5 10 15

45 Asp Gln Asp His
20

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
50 <213> péptido sintético

<400> 2
His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala
1 5 10 15

Glu Phe Ala Phe
20

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 5
 <400> 3
 Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn
 1 5 10 15

 Ser Thr Asn Ile
 20

 10
 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 <400> 4
 Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe
 1 5 10 15

 Ala Met Leu Ser
 20
 15

 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> péptido sintético
 <400> 5
 Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile
 1 5 10 15

 Leu Glu Gly Leu
 20

 25 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 30 <400> 6
 Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln
 1 5 10 15

 Ile His Glu Gly
 20

 35 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 <400> 7

Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro
1 5 10 15

Asp Ser Gln Leu
20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido sintético

<400> 8

Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Leu Lys
20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido sintético

<400> 9

Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys
1 5 10 15

Leu Tyr His Ser
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido sintético

<400> 10

Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu
1 5 10 15

Glu Ala Lys Lys
20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido sintético

<400> 11

Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln
1 5 10 15

Gly Lys Ile Val
20

ES 2 704 978 T3

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético

5

<400> 12

Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val
 1 5 10 15

Phe Ala Leu Val
 20

10

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético

15

<400> 13

Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Phe Glu Val
 20

20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético

25

<400> 14

Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp
 1 5 10 15

Gln Val Thr Thr
 20

30

<210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético

<400> 15

Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met
 1 5 10 15

Phe Asn Ile Gln
 20

35

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético

40

<400> 16

Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu
1 5 10 15

Met Lys Tyr Leu
20

5

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> péptido sintético

10

<400> 17

Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp
1 5 10 15

Glu Gly Lys Leu
20

15

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> péptido sintético

20

<400> 18

Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile
1 5 10 15

Ile Thr Lys Phe
20

25

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> péptido sintético

30

<400> 19

Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

His Leu Pro Lys
20

35

<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> péptido sintético

<400> 20

40

Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser
1 5 10 15
Val Leu Gly Gln
20

<210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 5 <400> 21

 Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala
 1 5 10 15

 Asp Leu Ser Gly
 20
 10 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 15 <400> 22

 Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys
 1 5 10 15

 Ala Val His Lys
 20
 20 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 <400> 23
 25 Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu
 1 5 10 15

 Ala Ala Gly Ala
 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> péptido sintético
 30 <400> 24

 Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro
 1 5 10 15

 Pro Glu Val Lys
 20
 35 <210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> péptido sintético

ES 2 704 978 T3

<400> 25

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
1 5 10 15

Gln Asn Thr Lys
20

5 <210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> péptido sintético

10 <400> 26

Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro
1 5 10 15

Thr Gln Lys

15 <210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> péptido sintético

<400> 27

20 Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo de una isoforma de alfa 1-antitripsina (A1AT) que tiene un peso molecular de aproximadamente 72 kDa o 58 kDa, en el que el epítipo consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.
5
2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un IgG1.
3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en el que el A1AT es una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de fluido peritoneal, una muestra de orina, o formas purificadas o filtradas de las mismas.
10
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en el que el A1AT está en una muestra de suero.
5. Un método para diagnosticar endometriosis en un sujeto, que comprende:
15
poner en contacto una muestra biológica del sujeto con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1; y
detectar la unión del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 con un epítipo de una isoforma de A1AT que tiene un peso molecular de aproximadamente 72 kDa o 58 kDa en la muestra biológica, en la que el epítipo consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y
20
en el que la muestra biológica es una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de fluido peritoneal, una muestra de orina, o formas purificadas o filtradas de las mismas.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la muestra biológica es una muestra de suero.
25
7. Un kit de diagnóstico para detectar una isoforma de A1AT que tiene un peso molecular de aproximadamente 72 kDa o 58 kDa que comprende, el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1; y
un agente adecuado para detectar la unión del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 con un epítipo de una isoforma de A1AT que tiene un peso molecular de aproximadamente 72 kDa o 58 kDa, en el que el epítipo consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.
30
8. El kit de diagnóstico de la reivindicación 7, en el que el A1AT es una muestra de biopsia, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de fluido peritoneal, una muestra de orina, o formas purificadas o filtradas de las mismas.
35
9. El kit de diagnóstico de la reivindicación 8, en el que el A1AT está en una muestra de suero.

FIG 1

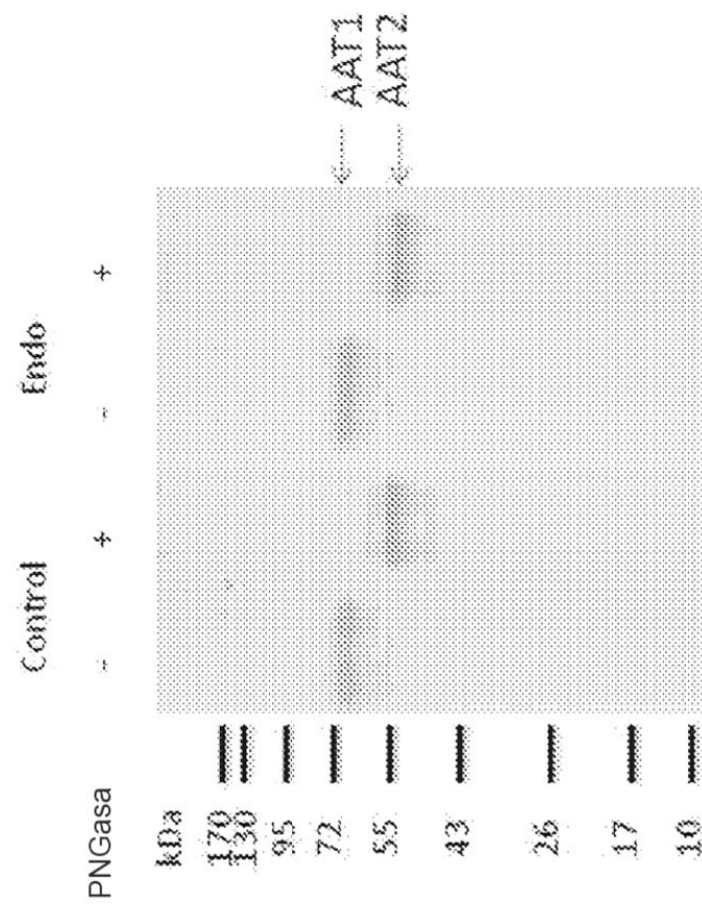


FIG 2

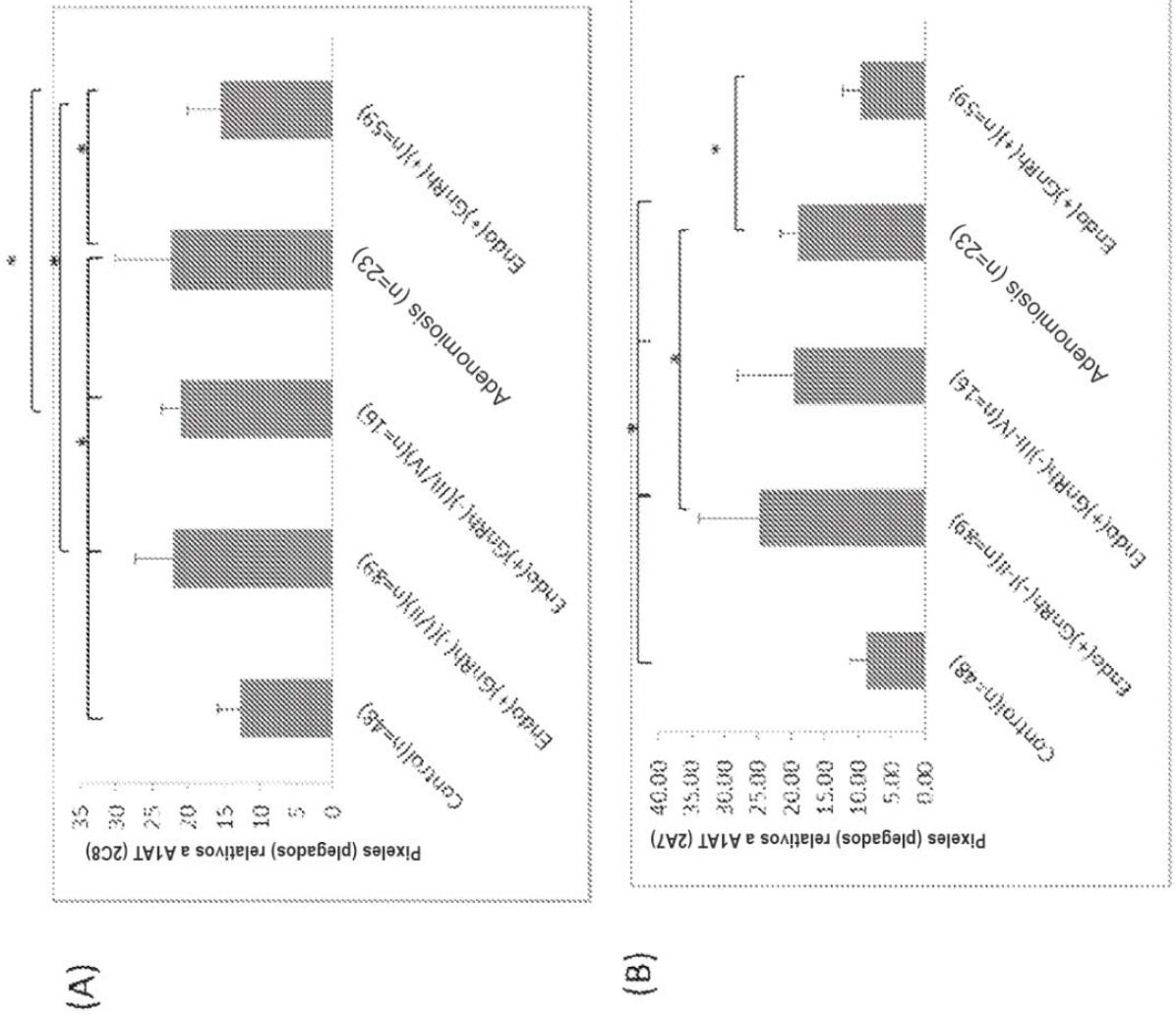


FIG 3

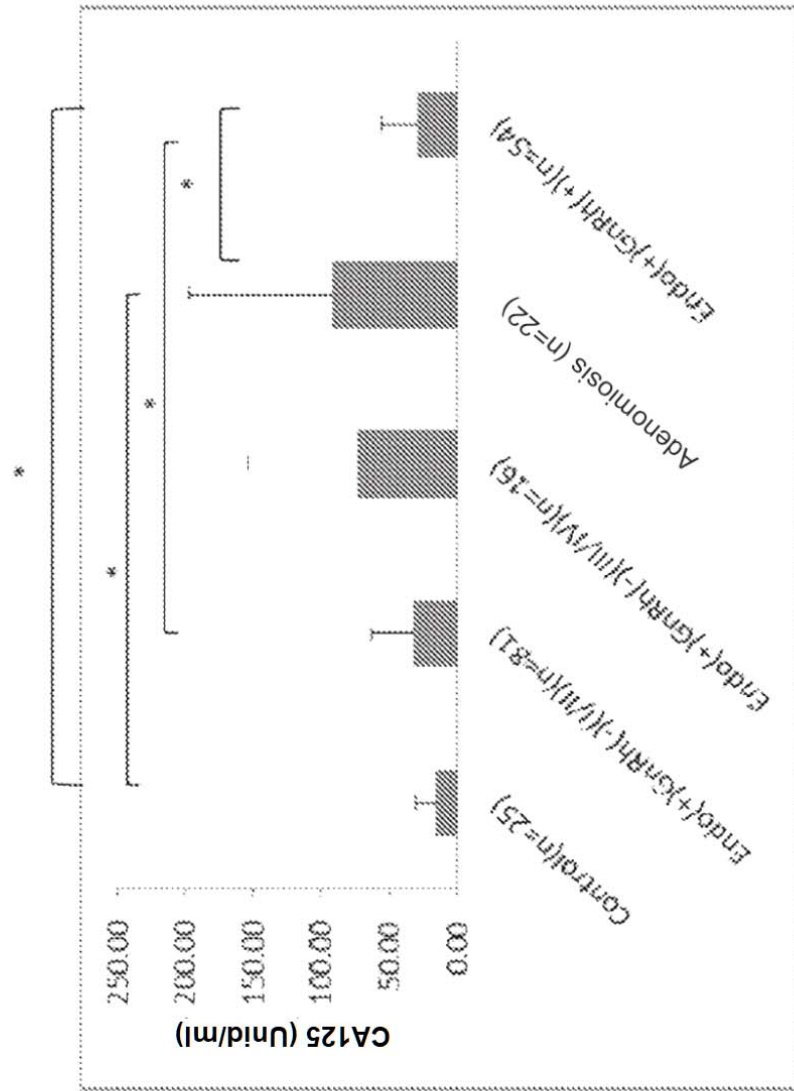


FIG 4

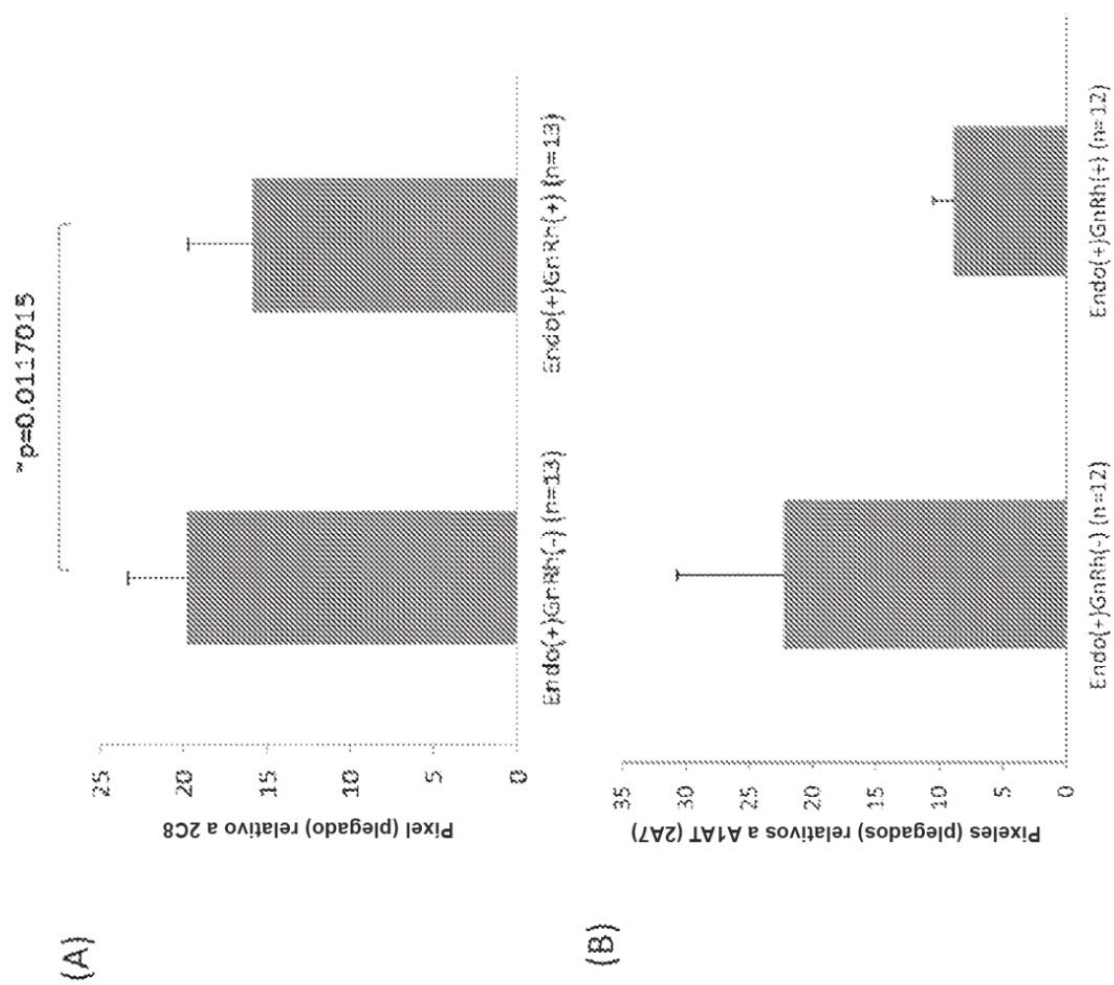


FIG 4

(C)

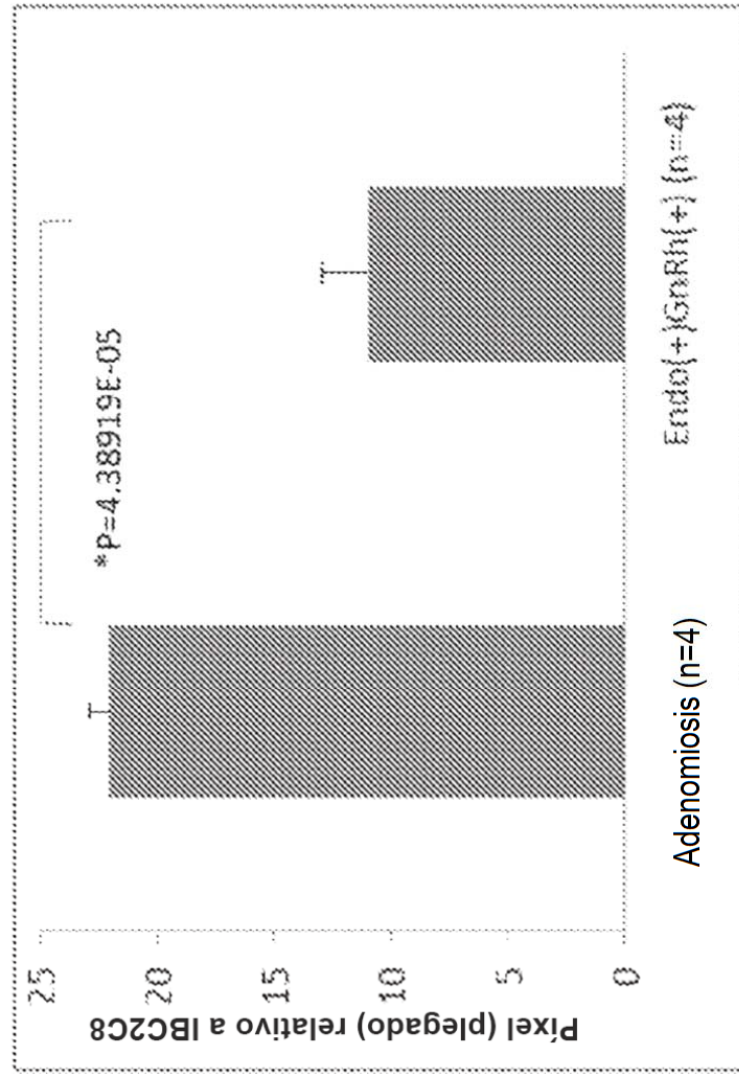


FIG 5

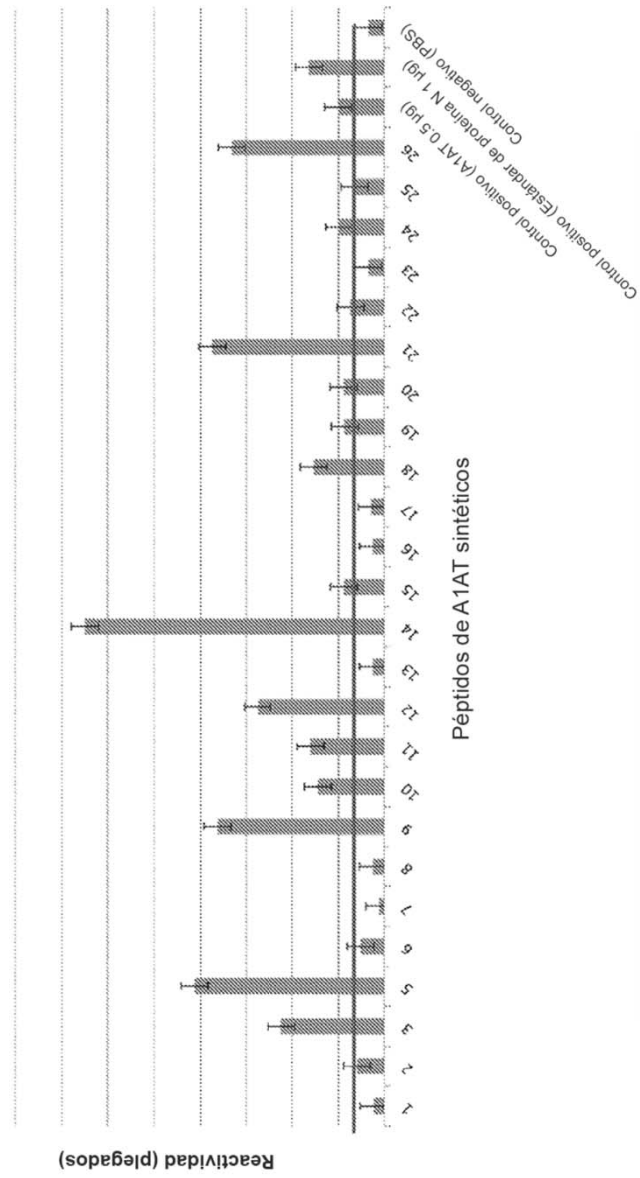


FIG 6

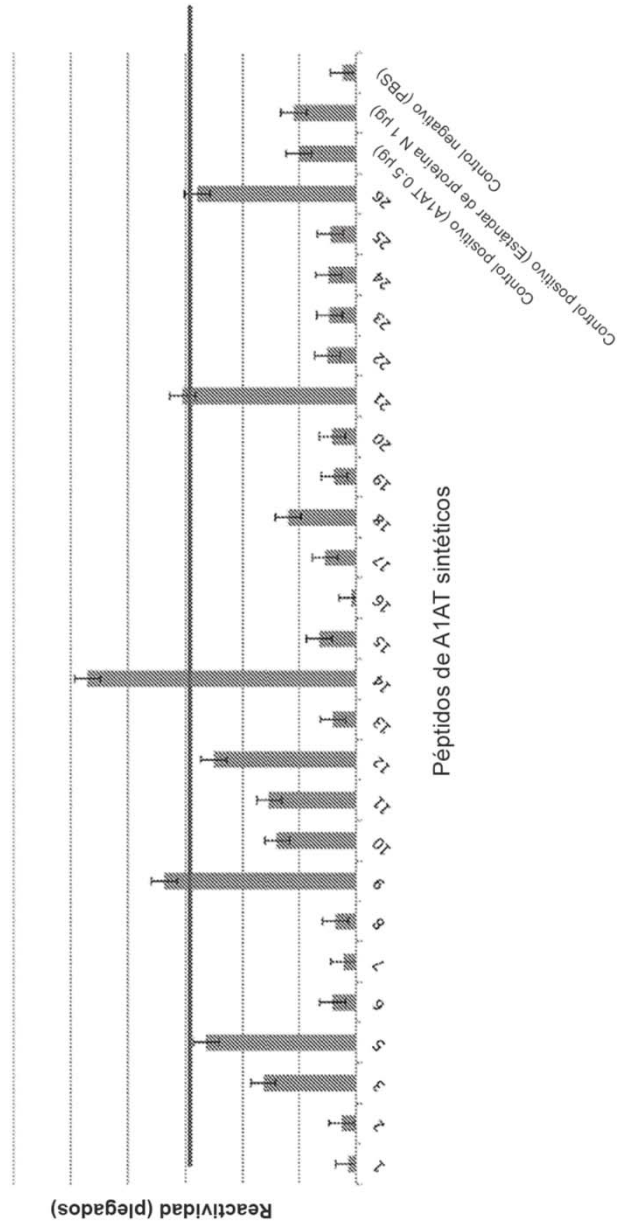


FIG 7

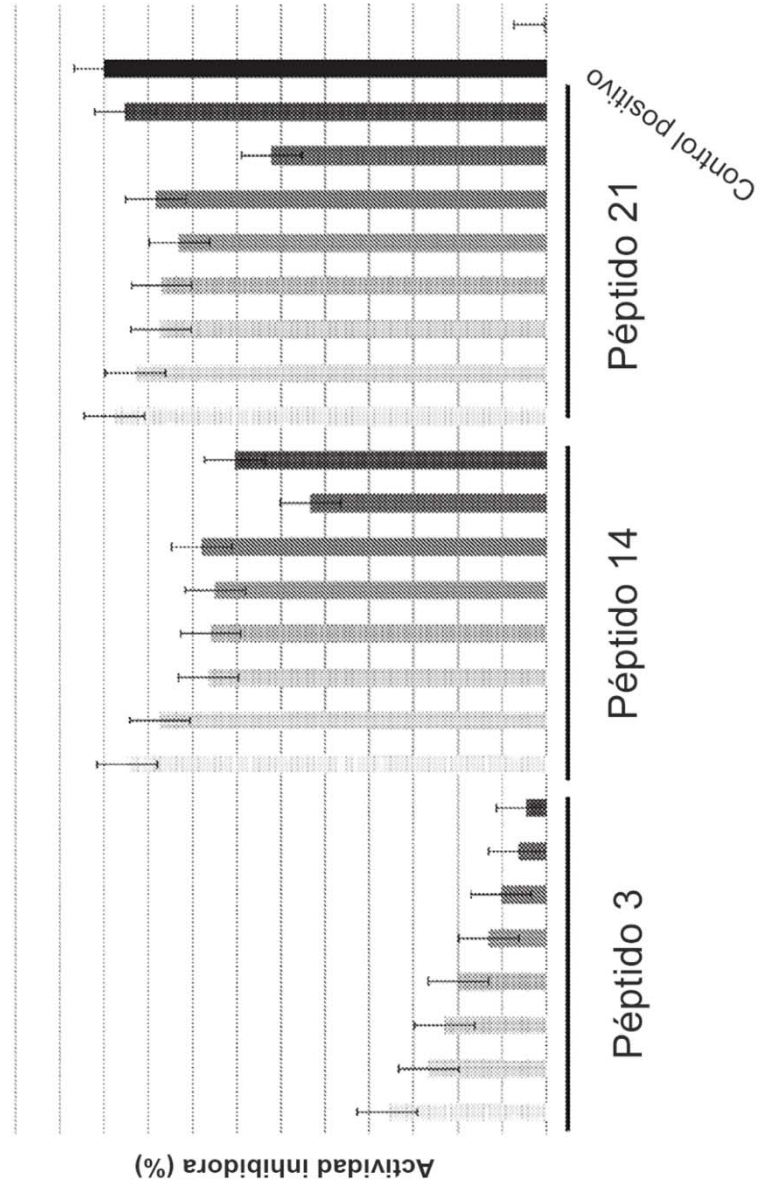


FIG 8

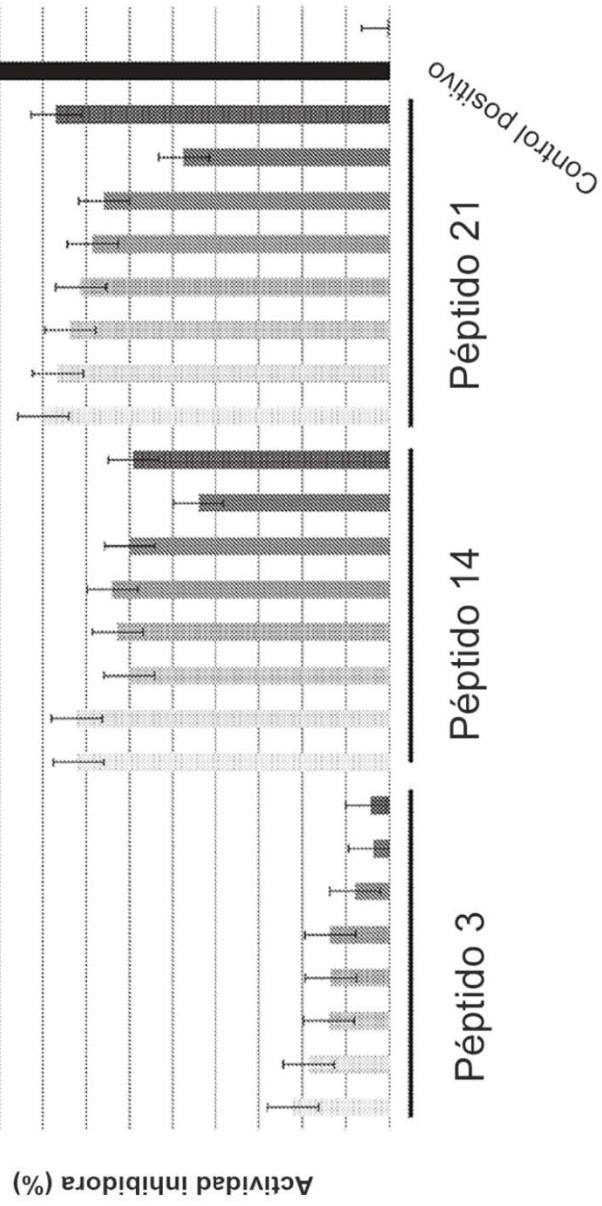


FIG 9

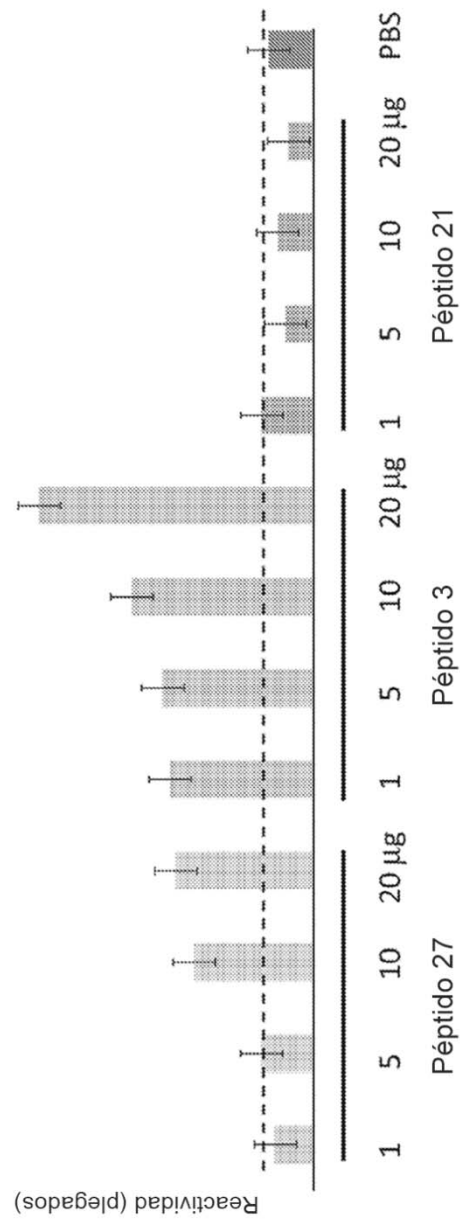


FIG 10

