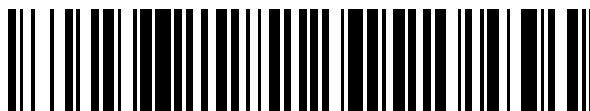


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 300**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/EP2013/053632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13124462**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13708713 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2817337**

54 Título: **Medios y métodos de medición de la hormona paratiroidea en pacientes que sufren de estrés oxidativo**

30 Prioridad:

22.02.2012 EP 12156441

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

11.06.2019

73 Titular/es:

**IMMUNDIAGNOSTIK AG (100.0%)
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, DE**

72 Inventor/es:

**ARMBRUSTER, FRANZ PAUL;
HOCHER, BERTHOLD;
GROEN, HANS JUERGEN y
ROTH, HEINZ JUERGEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 716 300 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

Medios y métodos de medición de la hormona paratiroidea en pacientes que sufren de estrés oxidativo

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a medios y métodos para medir la hormona paratiroidea en muestras de fluido corporal.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La hormona paratiroidea (PTH) se forma en la glándula paratiroidea (Glandulae parathyroideae) y se secreta en la circulación sanguínea. En la forma intacta consiste de una sola cadena polipeptídica que tiene 84 aminoácidos y un peso molecular de aprox. 9500 Dalton (ver SWISS-PROT: P01270, PTHY-HUMAN). Junto con la vitamina D y la calcitonina provoca la movilización de calcio y fosfato a partir del esqueleto óseo y aumenta la captación de calcio en los intestinos y la excreción de fosfato a través de los riñones. La concentración de péptidos de PTH biológicamente activos en plasma o suero es, por lo tanto, un importante parámetro de diagnóstico para determinar la presencia y el grado de hiper- o hipoparatiroidismo; para una cuantificación de la actividad de osteoblastos y/u osteoclastos; un tratamiento con vitamina D y metabolitos de la vitamina D; una estimación de la presencia de aluminio o una posible deficiencia de estrógenos en pacientes posmenopáusicas en diálisis; para determinar la dosis de esteroide o ciclosporina después de trasplantes de riñón o un tratamiento o prevención de cambios patológicos en la médula ósea, afecciones urémicas e insuficiencia renal crónica.

25 El hiperparatiroidismo secundario aparece con mayor frecuencia en la enfermedad renal crónica como respuesta adaptativa al deterioro de la función renal. Esto se debe a que la 1,25-dihidroxi-vitamin D circulante comienza a disminuir muy temprano en la etapa 2 de la enfermedad renal crónica y continúa disminuyendo a medida que la tasa de filtración glomerular (TFG) disminuye aún más, y la hidroxilasa-1 α renal se inhibe por hiperfosfatemia, hiperuricemia, acidosis metabólica y deficiencia de 25-hidroxivitamina D. A medida que la TFG disminuye por debajo de 60 mL/min/1.73 m², se retiene fosfato, lo que estimula la secreción de PTH. La hipocalcemia se desarrolla a medida que el TFG disminuye por debajo de 50 mL/min/1.73 m², lo que estimula aún más la liberación de PTH. Con la progresión de la enfermedad aumenta la vida media de la PTH intacta (aa 1-84) y se acumulan los fragmentos C-terminales de la hormona en el suero. Existe un relativo estado de resistencia de los órganos diana a la hormona, pero la elevación crónica de la misma tiene consecuencias importantes que resultan en la pérdida ósea, en particular del hueso cortical, fracturas, calcificación vascular, enfermedad cardiovascular y, por lo tanto, un aumento de la mortalidad cardiovascular (de Fraser WD, *Hyperparathyroidism*, Lancet. 2009; 374:145f). Un método fiable para determinar la concentración en suero de péptidos de PTH biológicamente activos es, por lo tanto, clave para detectar pacientes con hiperparatiroidismo, así como para el posterior seguimiento de las intervenciones terapéuticas. Kumar et al, "Quantification of serum 1-84 parathyroid hormone in patients with hyperparathyroidism by immunocapture in situ digestion liquid chromatography-tandem mass spectrometry" (Clin Chem. 2010 Feb; 56(2):306-13. doi: 10.1373/clinchem.2009.134643. Epub 2009 Dic. 10.) enseña la cuantificación de la PTH utilizando espectrometría de masas en tándem.

45 La primera generación de inmunoensayos para medir la PTH en suero se basó en péptidos de PTH bovina radiomarcados y antisueros policlonales contra la hormona paratiroidea (Berson SA et al, Proc Nat Acad Sci USA. 1963; 49:613-617). Como la actividad biológica se localiza en la porción amino-terminal del péptido de PTH, y el péptido de PTH, después de su secreción en circulación, se degrada en minutos en fragmentos activos e inactivos, el radioinmunoensayo detectó también productos de degradación inactivos. La primera generación de ensayos de PTH, por lo tanto, no produjo mediciones clínicas fiables, ya que los sueros de pacientes con insuficiencia renal contienen elevadas concentraciones de fragmentos de PTH inactivos.

50 La segunda generación de inmunoensayos utiliza dos anticuerpos, uno que se une a la porción amino-terminal del péptido de PTH con la actividad biológica y el otro en su porción C-terminal. Sin embargo, la caracterización con fragmentos sintéticos mostró que estos inmunoensayos también determinaron un fragmento grande inactivo de PTH (aa 7-84) (John MR et al. (1999), J. Clin. Endocrinol. Metab., 84:4287-4290; Gao P et al. 25 al. 2000, Póster M455, ASBMR 22^a Reunión Anual: Roth HJ et al. (2000), Poster P1288, 11^o Congreso Internacional de Endocrinología, Sydney). Esta co-determinación del fragmento grande inactivo de PTH (7-84) se hizo responsable de la discrepancia entre las concentraciones de PTH medidas y los hallazgos clínicos, ya que el fragmento grande de PTH está posiblemente compitiendo por el sitio de unión al receptor de PTH con los péptidos de PTH intactos.

60 Se ha desarrollado un ensayo de PTH de tercera generación para superar los problemas con los fragmentos grandes inactivos de PTH que, sin embargo, no mejoran el diagnóstico de enfermedades óseas u otros signos clínicos de hiperparatiroidismo secundario en pacientes urémicos (Brossard JH et al., *Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays*, Clin Chem. 2000; 46:697-703). Ha habido

especulaciones sobre errores sistemáticos en la determinación o resistencia a la PTH de los osteoblastos o una expresión reducida genéticamente del receptor de la PTH.

5 En resumen, generalmente se acepta en el campo que la hormona paratiroidea se escinde en el hígado, el riñón y la
 10 circulación en minutos en fragmentos activos e inactivos y que algunos fragmentos tienen una actividad biológica
 comparable a la de los péptidos de PTH intacta, mientras que otros como la hPTH (3-34) parecen inhibir los efectos
 de la hormona paratiroidea (ver EP-A 0 349 545; Schmidt-Gayk et al. (1999) Osteologie forum, 5,48-58), Suva et al.
 (1987) Science, 237.893ff; EP 0 451 867). Además, esos fragmentos grandes de PTH no (1-84) puede llevar a
 15 determinaciones erróneas (LePage R. et al. (1998) Clin. Chem., 44, 805-809). El término " fragmento grande de PTH"
 se ha acuñado para los fragmentos de PTH que carecen de residuos de aminoácidos en el extremo amino pero que
 se detectan mediante ensayos de PTH de 2ª generación. Además, la dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) se expresa en la
 superficie de muchos tipos de células y es una exopeptidasa de serina más bien indiscriminada. Esto condujo a la
 hipótesis de que la PTH era, además, *in vivo*, un sustrato de DPP4 o una exoproteinasa similar. En consecuencia, se
 20 ha desarrollado un inmunoensayo de dos sitios que emplea anticuerpos que pueden distinguir entre los péptidos
 biológicamente activos y los biológicamente inactivos de PTH a los que les faltan los 2 aminoácidos del extremo
 aminoterminal (véase WO 01/44818 (Armbruster et al.), WO 96/10041 (Magerlein et al). WO 03/003986 A2 (Hutchison
 JS) enseña métodos para preparar anticuerpos que reconocen un epítipo de la hormona paratiroidea humana activa.
 US 2007/098726 A1 describe métodos de generación de anticuerpos para detectar la hormona paratiroidea completa
 en una muestra.

25 Sin embargo, se encontró que las muestras de suero de pacientes urémicos pueden contener cadenas de polipéptidos
 de PTH intacta que están inactivas porque se oxidan en una de sus metioninas. Este tipo de oxidación parece ser
 particularmente relevante para los pacientes en diálisis cuyo plasma sanguíneo está expuesto a estrés oxidativo.
 Hoher et al, *Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress - do we need a fourth generation*
 30 *parathyroid hormone assay?* (PLoS One. 2012;7(7): e40242. doi: 10.1371/journal.pone.0040242. Epub 2012 6 de julio)
 sugiere que los métodos utilizados actualmente para detectar la PTH en la práctica clínica diaria pueden no reflejar
 adecuadamente anomalías óseas y cardiovasculares relacionadas con la PTH en pacientes en diálisis. Esto llevó al
 desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de la PTH no oxidada (aa 1-84) y sus fragmentos biológicamente
 35 activos. WO 02/082092 A2 (Armbruster et al) enseña un método para excluir las moléculas paratiroideas humanas
 oxidadas de la determinación de la actividad efectiva de parathormona en una muestra. No obstante, es necesario
 determinar por qué los pacientes urémicos con transformación ósea normal a veces tienen niveles séricos de PTH
 intacta que son más de 2,5 veces más elevados que en pacientes con riñones sanos (límite patológico en el caso de
 pacientes con riñones sanos; 65 µg PTH/L; para pacientes con afecciones de uremia: 165 µg PTH/L suero). Además,
 los pacientes urémicos con valores relativamente altos de PTH a menudo manifiestan diferencias significativas en la
 transformación ósea (Slatopolsky E et al, (2000), *Kidney Int.*, 58, 753-761). Por lo tanto, estos pacientes a menudo
 40 tienen en el suero entre ocho y diez veces mayor concentración de PTH, pero valores normales bajos de fosfatasa
 alcalina específica ósea (ostasa). Estos pacientes parecen estar libres de síntomas de una actividad excesiva de PTH.

Por lo tanto, el estado de la técnica todavía representa un problema. Es además un objetivo de la invención poner a
 45 disposición un método rápido y fiable para la determinación de la hormona paratiroidea activa en una muestra de un
 fluido corporal, el cual permite, en particular, la detección temprana de una función renal en deterioro.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

45 Este problema se resuelve mediante un método de obtención de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de
 anticuerpo monoclonal dirigido a un epítipo conformacional específico de la hormona paratiroidea humana (hPTH)
 inactivada oxidativamente, plegada incorrectamente, y sus fragmentos, que comprende los pasos de a) obtener
 anticuerpos contra péptidos de la hormona paratiroidea humana inmunizando a un animal no humano con un
 50 inmunógeno que comprende como hapteno la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de la hormona paratiroidea oxidada
 en la metionina 8, 18 o ambas, o un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de la hormona
 paratiroidea oxidada en la metionina 8, 18 o ambas; y recuperar los anticuerpos; b) seleccionar o purificar dichos
 anticuerpos de entre moléculas de anticuerpos que se unen al péptido de la hormona paratiroidea humana bioactiva
 en condiciones fisiológicas para obtener anticuerpos que reconozcan específicamente la hormona paratiroidea
 55 inactivada oxidativamente o sus fragmentos; c) seleccionar o purificar dichos anticuerpos contra la hormona
 paratiroidea oxidada de entre anticuerpos que se unen a un péptido de hPTH inactivado oxidativamente independiente
 de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en las posiciones 8, 18 o ambas, para obtener
 o aislar moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional (estructura terciaria de
 la proteína) de péptidos de la hormona paratiroidea humana inactivados oxidativamente y fragmentos circulares de
 los mismos, de modo que las moléculas de anticuerpo obtenidas se unen a un péptido de hPTH inactivado
 60 oxidativamente independiente de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en las posiciones
 8, 18 o ambas. La región determinante complementaria del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o anticuerpo de
 cadena sencilla reconoce específicamente un epítipo conformacional (determinante antigénico) que está presente en

la hormona paratiroidea oxidada y en fragmentos de la misma, pero no en la hormona paratiroidea humana bioactiva normal.

5 La divulgación se refiere además a una región determinante complementaria que reconoce un epítipo conformacional presentado por la hormona paratiroidea humana o un fragmento de la misma que comprende en las posiciones 8, 18 o ambas, metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona. La región determinante complementaria también puede reconocer un epítipo conformacional de una hormona paratiroidea humana o un fragmento de la misma que comprende triptófano oxidado en la posición 22 y/o que carece de los aminoácidos del extremo aminoterminal en las posiciones 1 y 2 o ambas. Para ser claros, es la hormona paratiroidea humana o un fragmento de la misma la que comprende en su secuencia de aminoácidos en las posiciones 8, 18 o 22 aminoácidos oxidados. Esto no significa que el epítipo conformacional esté formado por una estructura primaria que comprende cualquiera de estos aminoácidos oxidados, sino que el epítipo conformacional es una estructura terciaria formada por la secuencia de PTH oxidada que ha cambiado hacia una estructura terciaria alternativa y el epítipo conformacional es una porción característica de esa estructura terciaria alternativa por la cual el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo respectivo reconoce todos los tipos de estructuras de PTH oxidadas o mal plegadas.

El anticuerpo divulgado puede ser un anticuerpo monoclonal de ratón o rata. El inmunógeno preferido para la exposición, preferiblemente administrado con Freund's incompleto (solo aceite mineral), es una proteína portadora que tiene unida como hapteno hormona paratiroidea humana sintética oxidada, fragmento sintético oxidado de hormona paratiroidea humana o péptido sintético oxidado que comprende la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de la hormona paratiroidea humana o porción sustancial, fragmento o variante de la misma. Los anticuerpos generados por esta exposición se pueden aislar o cribar mediante cromatografía de afinidad utilizando fragmentos de hormona paratiroidea humana sintética oxidada ligados a una fase sólida o una molécula marcadora. La criba o el aislamiento del anticuerpo se realiza utilizando un epítipo conformacional compuesto por la hormona paratiroidea humana oxidada o un fragmento de la misma, que comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos 3 a 34 en la que la metionina en la posición 8 probablemente se oxida primero.

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un material de unión para eliminar la hormona paratiroidea humana oxidada de una muestra, como una muestra de suero de un paciente en diálisis, cuyo material de unión comprende, unido a una fase sólida, anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos monoclonales de cadena sencilla como se describió anteriormente para la unión a péptidos de hPTH inactivada oxidativamente independiente de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en las posiciones 8, 18 o ambas, y dichas moléculas de anticuerpo se unen específicamente a un epítipo conformacional de péptidos de hormona paratiroidea humana inactivada oxidativamente y fragmentos circulantes de la misma. El material de unión puede estar en forma de una suspensión, preferiblemente una suspensión de esferas de sefarsa que tienen covalentemente unido un anticuerpo conformacional para PTH oxidada y sus fragmentos.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para medir la concentración de la hormona paratiroidea humana en una muestra de un fluido corporal que comprende el paso de poner en contacto la muestra con una fase sólida o una suspensión acuosa como se ha descrito, que comprende anticuerpos que reconocen la hormona paratiroidea oxidada, y medir la concentración de la hormona paratiroidea en el flujo o sobrenadante.

Este método de medición de la concentración de hormona paratiroidea humana en una muestra de un fluido corporal puede comprender el paso de medir la concentración de hormona paratiroidea mediante un inmunoensayo de dos sitios en el que un anticuerpo se une en la porción aminoterminal con los aminoácidos 1 a 34 de la hormona paratiroidea.

La divulgación abarca además un método para medir la concentración de hormona paratiroidea humana en una muestra, que comprende el paso de medir la concentración de fragmentos de hormona paratiroidea mediante espectroscopia de masas en tándem, opcionalmente precedida por cromatografía líquida moderna.

Otro aspecto de la descripción se refiere al uso de un material de unión como se ha descrito anteriormente en un método para determinar el hiperparatiroidismo secundario *in vitro*, la insuficiencia renal o ambos.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención se entiende mejor cuando se lee junto con las tablas y figuras adjuntas, que sirven para ilustrar los aspectos preferidos de la invención.

60 Fig.1A muestra las fórmulas de metionina y sus formas oxidadas, metionina sulfóxido y metionina sulfona. Hay dos metioninas en las posiciones 8 y 18 en la cadena polipeptídica de la PTH madura.

Fig.1B muestra una representación esquemática del nuevo método para medir la hormona paratiroidea en muestras humanas.

Fig.2A muestra un cromatograma de iones total NanoLC-ESI-FTMS de hPTH(1-84)ox sintético oxidado no digerido.

Fig.2B muestra un espectro FTMS sumado ampliado para el intervalo de tiempo de retención de 18,30 a 20,50 minutos, espectro que comprende varios iones analitos diferentes cargados que pertenecen a PTHox y sus fragmentos.

Fig.3A muestra un cromatograma de iones total NanoLC-ESI-FTMS de la fracción de flujo a través de la columna de afinidad que une PTH(1-84)ox sintético oxidado.

Fig.3B es un espectro FTMS sumado ampliado para el intervalo de tiempo de retención de 16,50-18,50 minutos, espectro que no muestra ninguna masa de analitos pertenecientes a PTH o PTH oxidada.

Fig. 4A muestra un cromatograma de iones total NanoLC-ESI-FTMS de un eluido de la columna de afinidad que comprende hPTH(1-84)ox sintético oxidado no digerido.

Fig. 4B es un espectro FTMS sumado ampliado para un intervalo de tiempo de retención de 16,50-18,50 minutos que comprende varios iones analitos diferentes cargados de PTH.

Fig. 5 muestra, para comparar, el espectro ampliado del material de partida que comprende hPTH(1-84)ox sintético oxidado no digerido (Fig. 1B) y el eluido correspondiente después de unirse a una columna de afinidad (Fig. 3B).

Fig. 6 es un diagrama de barras que compara los "valores de PTH intacta" directamente determinados en el suero de pacientes en diálisis (barras azules); para más detalles, consulte también la Tabla 2, y después de la eliminación de péptidos de PTH oxidados y mal plegados de la muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La oxidación del péptido de la hormona paratiroidea (PTH) en los residuos de metionina 8 y/o 18 da como resultado una pérdida de actividad biológica. (Galceran T et al., *Absence of biological effects of oxidized parathyroid hormone-(1-34) in dogs and rats*, *Endocrinology* 1984; 115(6): 2375-2378. Horiuchi N et al., *Effects of oxidation of human parathyroid hormone on its biological activity in continuously infused, thyroparathyroidectomized rats*, *J Bone Miner Res* 1988; 3 (3): 353-358. Zull JE et al., *Effect of methionine oxidation and deletion of amino-terminal residues on the conformation of parathyroid hormone*, *Circular dichroism studies*, *J Biol Chem* 1990; 265 (10):5671-5676). Así, estudios realizados por grupos independientes han demostrado que la oxidación de la PTH disminuye su interacción con el receptor respectivo y que los péptidos oxidados de PTH no pueden estimular el receptor de PTH para generar cAMP, el segundo mensajero de PTH. WO 2002/082092 (Roth HJ et al) describe un inmunoensayo de dos sitios que puede distinguir entre PTH oxidada y "PTH bioactiva" y en el que se agregan anticuerpos de enmascaramiento que se unen a la metionina 8 o 18 oxidada, de modo que un anticuerpo del inmunoensayo de dos sitios ya no puede unirse a un sitio cercano que comprende el dominio de unión al receptor paratiroideo debido a los impedimentos estéricos. Otros estudios demostraron que tales anticuerpos de enmascaramiento deben superar el problema inmunológico de que la oxidación de la metionina da lugar a dos estereoisómeros diferentes, metionina S-sulfóxido (Met-S-O) y metionina R-sulfóxido (Met-R-O) con el azufre como centro quiral, o incluso metionina sulfona (MetO₂), por lo que dichos anticuerpos deben unirse a una gran cantidad de estructuras primarias, además del problema de que una multiplicidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) posiblemente estén involucradas en la oxidación de la hormona paratiroidea.

La oxidación del sulfóxido de metionina se inhibe *in vivo* por los antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA) como el glutatión, el dipéptido de histidina, el ácido úrico, la bilirrubina, el ácido ascórbico o el tocoferol. Una vez que se ha oxidado la PTH que comprende un Met-S-O y Met-R-O, la metionina sulfóxido reductasa endógena de tipo A (MRSA) puede reducir solo Met-S-O, pero no Met-R-O. Queda por demostrar si hay una epimerasa de metionina sulfóxido u otras vías para reducir el estereoisómero Met-R-O. Por lo tanto, la oxidación de la PTH es solo parcialmente reversible, dependiendo de si la oxidación resultó en Met-S-O, Met-R-O o MetO₂. La oxidación a MetO₂, sin embargo, no es reversible. No obstante, los autores de la presente invención descubrieron que cualquier oxidación de metionina de la PTH afecta a su plegamiento y estructura terciaria, ya que las metioninas oxidadas son menos hidrófobas y más polares. Esto puede explicar por qué los ensayos de PTH intacta que se usan convencionalmente en la práctica clínica reflejan deficientemente las anomalías óseas y cardiovasculares relacionadas con la PTH.

La presente divulgación proporciona un método rápido y fiable para eliminar todas las formas de polipéptidos de PTH oxidada o mal plegada de muestras de suero o plasma, es decir, todas las moléculas de PTH que han adquirido una nueva estructura terciaria debido al estrés oxidativo y/o la oxidación de metionina. La presente divulgación proporciona un método de medición de la cantidad o concentración de moléculas de PTH bioactiva plegada correctamente en una

muestra de suero que es particularmente importante para los pacientes en diálisis. En los ejemplos a continuación utilizamos el método y la estrategia de ensayo aquí descritos en una población de pacientes que se sabe que están expuestos a estrés oxidativo: etapa final: pacientes con enfermedad renal en hemodiálisis intermitente (Witko-Sarsat V et al, *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia*. *Kidney Int.* 1996 May; 49(5):1304-13). La presente descripción demuestra que los métodos establecidos para medir la PTH generalmente producen concentraciones plasmáticas de PTH activa demasiado elevadas, en comparación con los resultados que consideran el estado de plegamiento y oxidación de la PTH. Además, la correlación demostró ser muy débil entre las mediciones convencionales de PTH y las mediciones después de la eliminación de todas las cadenas polipeptídicas de PTH oxidada y mal plegada.

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo para un epítipo conformacional común que es específico para todas las formas de hormona paratiroidea oxidada y fragmentos de la misma, que comprende al menos la secuencia de aminoácidos 3 a 34 de la hormona paratiroidea, siendo biológicamente inactiva. Esta definición debe abarcar todas las formas de hormona paratiroidea humana oxidada, particularmente oxPTH(aa 1-84), oxPTH(aa 1-52), oxPTH(aa 1-34), oxPTH(1-36), oxPTH(aa 1-37), oxPTH(1-38), oxPTH(aa 3-84), oxPTH(aa 3-38), etc. El epítipo conformacional específico para la hormona paratiroidea humana mal plegada y/u oxidada se compone, así, de estructuras presentes en la porción aminoterminal de la hormona paratiroidea. Todas las formas oxidadas de la hormona paratiroidea humana parecen estar inactivas y mal plegadas. Por lo tanto, la divulgación comprende la información de que la porción aminoterminal de la hormona paratiroidea humana puede girarse hacia una conformación terciaria alternativa que es biológicamente inactiva. El cambio de conformación alternativo se puede lograr probablemente también mediante una eliminación del segundo aminoácido o más (6) en el extremo aminoterminal o por una oxidación de los residuos de metionina en las posiciones 8, 18 o ambas, las cuales hacen que la cadena lateral hidrofóbica de la metionina sea más polar e hidrófila, o incluso por una oxidación del triptófano en la posición 23. Debido a las bajas cantidades de hormona paratiroidea en suero, sin embargo, no está del todo claro cuál de esos "mecanismos de degradación o inactivación" son fisiológicamente más relevantes. En otras palabras, queda por examinar si los "fragmentos grandes de PTH" en el suero son productos de degradación de la hormona paratiroidea previamente oxidada o viceversa, y si la oxidación apunta a un mecanismo biológico de inactivación.

La presente divulgación también se refiere a un método de obtención de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo conformacional o un determinante antigénico de la hormona paratiroidea humana oxidada, mal plegada o inactivada. La divulgación proporciona además un reactivo para la eliminación de la hormona paratiroidea humana oxidada, mal plegada o inactivada de fluidos corporales como suero, plasma o sangre entera. Una realización preferida se refiere a un material de columna con un anticuerpo unido covalentemente que reconoce un epítipo conformacional específico para la hormona paratiroidea inactiva, oxidada y/o mal plegada o fragmentos de la misma, que comprenden al menos los aminoácidos 3 a 34 de PTH. La divulgación proporciona un anticuerpo que no reconoce hPTH (aa1-84) biológicamente activa o fragmentos biológicamente activos de la misma, pero solo péptidos de PTH inactiva que son modificados u oxidados en cualquier posición en la porción aminoterminal 1 al 38 de la hormona paratiroidea, tal que esta porción se transforma en otra conformación terciaria en la cual es inactiva y no puede unirse a su receptor.

La divulgación proporciona métodos y medios de medición de la concentración de hormona paratiroidea activa en suero o plasma de pacientes, especialmente pacientes en diálisis y sujetos a especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Oxidación de hPTH(aa 1-84)

200 µg de PTH(1-84) humana obtenida de Bachem AG (Bubendorf, Suiza) se disolvieron en 400 µL de ácido acético 0,1 M (concentración final 0,5 µg/µL), se mezclaron 1:1 con peróxido de hidrógeno al 30% y se incubaron durante 45 min a 37°C para obtener una mezcla de péptidos PTH(1-84) oxidados en las metioninas 8, 18 y ambos. Posteriormente, la mezcla se enfrió en hielo, se dividió en alícuotas y se liofilizó.

Oxidación del conjugado hPTH(aa 1-38)

Péptido humano de PTH(aa1-38) (Art.Núm.A1105AG.1, Immundiagnostik AG), Bensheim, Alemania) se acopló a tiroglobulina bovina mediante el método de la carbodiimida, se disolvió en 1,0 mL de tampón de acetato al 0,1%, pH 5,0, se mezcló 1:1 con 30% de peróxido de hidrógeno y se incubó durante 18 horas a 37°C para obtener el conjugado oxPTH(aa 1-38).

Oxidación de biotina-hPTH(aa 1-38)

Péptido PTH(aa 1-38) humano (Art. No A11D5AG.1, Immundiagnostik AG, Bensheim, Alemania) se disolvió en 1,0 mL de tampón de acetato al 0,1%, pH 5,0, se mezcló 1:1 con 30% de peróxido de hidrógeno y se incubó durante dos horas a 37°C para obtener péptidos PTH(aa 1-38)ox. Después de la liofilización, la PTH(aa 1-38)ox se conjugó con biotina usando biotina sulfosuccinimidil éster soluble en agua.

5

EJEMPLO 2

Anticuerpos monoclonales contra un epítipo de conformación de PTH(aa 1-38) oxidada

Los anticuerpos monoclonales se generaron en ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron con 200 µg del conjugado de tiroglobulina PTH(aa 1-38)ox para inmunizaciones primarias y secundarias con Freund's incompleto (solo aceite mineral) en la cavidad intraperitoneal. Cada uno de los antisueros se probó para determinar su unión a biotina-hPTH(1-38) no oxidada. Para detectar anticuerpos que reconocen específicamente los péptidos oxPTH(aa 1-38), utilizamos la técnica de separación de anticuerpo doble y, como trazador, biotin-oxPTH(aa1-38) marcado con estreptavidina-¹²⁵I. Después de la fusión celular y la selección de HAT, los hibridomas seleccionados se cribaron de la misma manera, esto es, para la unión a la PTH(aa 1-84) oxidada humana pero no a la PTH(aa 1-84) humana.

10

15

Para la caracterización definitiva de la especificidad de los anticuerpos monoclonales (MAB) y para la identificación de un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de conformación común a los péptidos hPTH(aa 1-38) oxidados, es decir, común a todas las formas de hPTH(aa 1-38) oxidada independientemente del estado de oxidación y quiralidad (Met-R-O, Met-S-O y MetO₂ en las posiciones 8, 18 y ambas), el anticuerpo fue inmovilizado en sefrosa 4B activada por CNBr (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia). Una alícuota de 100 µL de la suspensión se introdujo en una columna (MobiSpinColumn, MoBiTec, Goettingen, Alemania) y se equilibró con tampón PBS, pH 7,4. Luego se disolvieron 2,5 µg de hPTH(1-84) oxidada liofilizada en 300 µL de tampón de equilibrado y se aplicaron a la columna. La columna se incubó de extremo a extremo durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con 300 µL de tampón de equilibrado, seguido de 3 lavados con 300 µL de agua destilada, y entonces se eluyó 2 veces con 200 µL de tampón de elución (TFA al 0,1%). El flujo, las fracciones de lavado (tampón de equilibrado y agua) así como el eluido de la columna, se recogieron por separado, se liofilizaron y se analizaron mediante nanoLC-ESI-FT-MS. Dado que la hPTH(aa1-38) oxidada produce regularmente una variedad de fragmentos de PTH oxidada, oxidados en las posiciones 8, 18 o ambas, se puede seleccionar un anticuerpo o clon de anticuerpo que se une a la hormona paratiroidea oxidada independientemente del tipo específico de oxidación de la proteína. En consecuencia, se seleccionó un anticuerpo monoclonal ("oxPTH-ConforMAB") que reconoce un epítipo de conformación presente en todas las formas de hPTH(aa 1-84) oxidada y fragmentos de la misma para su posterior análisis y caracterización. El oxPTHConforMAB seleccionado reconoció específicamente con alta afinidad todas las formas de fragmentos de hPTH oxidada y mal plegada, pero no la PTH(aa 1-84) no oxidada.

20

25

30

35

EJEMPLO 3

nanoLC-ESI-FT-MS/MS

40

Con el fin de investigar la oxidación de la PTH(aa 1-84) humana del ejemplo 1, la muestra se analizó directamente mediante nanoLC-ESI-FT-MS/MS de alta resolución para determinar las masas totales de las especies moleculares y después de la escisión con tres endoproteasas (ArgC, LysC y quimotripsina) para caracterizar las oxidaciones de metionina en las posiciones 8 y/o 18.

45

Las muestras de PTH(aa 1-84) humana no digerida y oxPTH(aa1-84) se aplicaron directamente a la nanoLC-ESI-FT-MS después de la acidificación con ácido fórmico al 2%.

50

Las muestras de PTH(aa 1-84) humana oxidada digerida (1 nmol) se desnaturalizaron mediante digestión previa con urea 8 M que contenía 20 mM de agente reductor TCEP (tris [2-carboxil]-fosfina) durante 30 min. Se añadió yodoacetamida a una concentración final de 50 mM y las mezclas se incubaron en la oscuridad durante otros 20 minutos. Después de la dilución a urea 0,8 M, las muestras se digirieron con ArgC, LysC y quimotripsina, respectivamente, de acuerdo con los SOP de Proteome Factory, Berlín, DE. La proporción de enzima a proteína (p/p) fue 1:50 en cada digestión. Los digeridos de péptidos acidificados (ArgC, LysC y quimotripsina) se agruparon y se aplicaron al análisis nano-LC-ESI-MS (LTQ-FT, Thermo Scientific) utilizando un gradiente de nanoLC de 35 minutos (sistema Agilent 1100 nanoLC) con disolvente A (0,1% ácido fórmico / 5% acetonitrilo / 94,9% ddH₂O) y disolvente B (0,1% ácido fórmico / 99,9% acetonitrilo).

55

60

Para el ensayo, la hPTH(1-84) sintética oxidada del ejemplo 1 se sometió a cromatografía de afinidad en una columna que comprende el anticuerpo monoclonal específico de conformación oxPTH (MAB) que se une a un determinante antigénico solo presente en oxhPTH(aa 1-84) y las cadenas polipeptídicas de hPTH(aa 1-38) oxidada, pero no en la hPTH plegada correctamente, cuyo determinante antigénico no abarca metionina sulfóxido o metionina sulfona. No se detectó mediante nanoLC-ESI-FTMS hPTH(1-84) oxidada o fragmentos de la misma después de la eliminación de las

moléculas de PTH oxidadas en la muestra, de modo que todas las formas de PTH oxidadas de la muestra en cuestión fueron reconocidas por el oxPTH-ConformMAB en la columna de inmunoafinidad y se eliminaron cuantitativamente del flujo. La precisión de masa para los datos de MS fue mejor que 5 ppm. Los datos de MS se analizaron por MASCOT (Matrixscience) y Qualbrowser (Thermo Scientific) según a las masas peptídicas predichas. Los resultados se

5

TABLA 1
Masas deducidas de picos cargados en los espectros de hPTH(aa1-84)ox no digerido y eluido (fragmentos oxPTH unidos a columna)

10

MASA [M/Z]	CARGA Z	MW [DA]	INCREMENTO MW
728,16	13	9453,08	+32
729,39	13	9469,07	+48
730,62	13	9485,06	+64
731,85	13	9501,05	+80
780,50	12	9354,00	+32
781,83	12	9369,96	+48
783,17	12	9386,04	+64
788,76	12	9453,12	+32
790,09	12	9469,08	+48
791,42	12	9485,04	+64
792,75	12	9501,00	+80
851,36	11	9353,96	+32
852,82	11	9370,02	+48
854,27	11	9385,97	+64
860,28	11	9452,08	+32
861,73	11	9468,03	+48
863,19	11	9484,09	+64
864,64	11	9500,04	+80

15

20

No se observaron picos de masa significativos que puedan asignarse a alguna de las especies de hPTH(1-84)ox mediante análisis nanoLC-ESI-FT-MS de las fracciones de flujo y lavado (tampón de equilibrado y agua) de la columna (Fig. 3A, B), mientras que varios picos de masa correspondientes a los diferentes estados oxidados de hPTH(1-84)ox fueron detectados en el eluido (Fig. 4A, B; Tabla 1). La comparación de los espectros del material de partida, hPTH(1-84)ox sintético oxidado no digerido (Fig. 2B) y el eluido de la columna de afinidad de hPTH(1-84)ox sintético oxidado no digerido (Fig. 4B) en la Fig. 5 reveló el mismo perfil a pesar de la diferencia en la intensidad máxima. Los resultados demuestran que la hPTH(1-84) sintética oxidada consistió de una variedad considerable de productos correspondientes a las diferentes metioninas oxidadas. Sin embargo, la columna con el anticuerpo monoclonal (MAB) generado contra la PTH humana oxidada fue específica para todas las formas de hPTH(1-84) oxidada y las eliminó a todas de la prueba.

25

Más en detalle, la muestra de hPTH(1-84) intacta oxidada mostró picos TIC a los 18 - 20 min. Las masas moleculares correspondieron a valores desplazados por +16, +32, +48, +64 Da causados por la oxidación de metionina (sulfóxido, +16 Da y sulfona, +32 Da por cada residuo, y combinaciones de los mismos, máximo +64 Da) y por +80 Da para la oxidación adicional de triptófano 23. La Figura 2A muestra un cromatograma de iones total NanoLC-ESI-FTMS de hPTH(aa 1-84) sintética oxidada no digerida y la Figura 2B el correspondiente espectro FTMS sumado ampliado para el intervalo de tiempo de retención de 18,30-20,50 minutos. Se han marcado varios iones analitos diferentes cargados.

30

La Fig. 3 muestra el análisis de la fracción del flujo de hPTH(1-84)ox sintético oxidado no digerido después de la unión a la columna de inmunosorción. La Fig. 3A muestra un cromatograma de iones total nanoLC-ESI-FTMS del flujo y la Fig. 3B el correspondiente espectro FTMS sumado ampliado para el intervalo de tiempo de retención de 16,50-18,50 minutos. El espectro no muestra masas de analitos pertenecientes a PTH oxidada.

35

La Figura 4 se refiere al eluido de la columna de afinidad del hPTH(1-84)ox oxidada no digerida. La Fig. 4A muestra el cromatograma de iones total nanoLC-ESI-FTMS del eluido y la Fig. 4B de nuevo el correspondiente espectro FTMS

sumado ampliado para el intervalo de tiempo de retención de 16,50-18,50 minutos. Se detectaron varios iones analitos diferentes cargados de oxPTH(aa 1-84) en el eluido.

5 Por lo tanto, los ejemplos confirman que todas las formas oxidadas y mal plegadas de la hormona paratiroidea humana y sus fragmentos tienen un epítipo conformacional característico que puede usarse para la eliminación de estos fragmentos de una muestra para la determinación de la concentración de hormona paratiroidea biológicamente activa.

EJEMPLO 4

10 Estudiamos especímenes de 18 pacientes en hemodiálisis intermitente tratados en nuestra unidad de diálisis. Los especímenes (sangre entera con EDTA) se tomaron antes del inicio de la sesión de diálisis, se centrifugaron y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta un análisis adicional después de obtener plasma. El estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital local. Se obtuvo consentimiento informado por escrito en cada caso. Las características de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes. El fósforo sérico, el calcio y la proteína C reactiva (CrP) se analizaron en un analizador automático del laboratorio clínico del hospital universitario Charité.

20 El inmunoensayo electroquimioluminescente de PTH-intacta (ECLIA: Roche PTH, Intact [iPTH]) se utilizó para medir la concentración de PTH. El PTH ECLIA intacto de Roche utiliza un anticuerpo monoclonal biotilado, el cual reacciona con los aminoácidos 26-32, y un anticuerpo monoclonal de captura de complejos de ruteno, que reacciona con los aminoácidos 55-64. Las determinaciones se realizaron en un Roche Modular E 170®. El CV de intraensayo fue de 4,1% y el CV de interensayo fue de 5,8% a concentraciones de 35,0 y 180,0 ng/L, respectivamente.

25 Las muestras humanas se midieron bien directamente (llamado iPTH en la Tabla 2) o después de eliminar la PTH oxidada mediante una columna que elimina la PTH oxidada utilizando el anticuerpo de conformación oxPTH monoclonal seleccionado, descrito en el Ejemplo 2, que reconoce todas las formas de PTH oxidada y fragmentos de PTH oxidada. Más en detalle, la columna de unión oxPTH-ConforMAB se usó con muestras de 18 pacientes en diálisis, seguida de un PTH ECLIA de sándwich clásico tal como se usa en la práctica clínica diaria.

TABLA 2

PACIENTE Nr	ENFERMEDAD RENAL	EDAD AÑOS	TIEMPO EN DIALISIS (AÑOS)	SEXO	IPTH (NG/L)	IPTH REAL	ox- iPTH (ng/L)	RELACION IPTH/ IPTH REAL	TOTAL CA (MMOL/L)	P (MMOL/L)	CRP (MG/DL)
1	Nefropatía hipertensiva	62	0,3	m	43,36	8,9	34,73	0,204	2,58	1,24	0,43
2	Nefropatía diabética	73	4,0	m	796,2	70,62	725,6	0,089	2,2	2,15	-
3	Desconocido	37	0,1	m	52,84	10,35	42,49	0,196	2,53	0,81	0,03
4	Nefropatía diabética	68	2,1	f	70,8	11,18	59,62	0,158	2,23	0,91	4,08
5	Lesión renal aguda	64	0	m	46,49	9,45	37,04	0,203	2,17	1,32	3,26
6	Nefropatía diabética	63	1,6	f	42,13	5,37	36,76	0,127	2,08	1,43	12,2
7	ADPKD	70	3,3	f	1029,00	74,76	954,2	0,073	2,1	1,37	0,53
8	Síndrome cardiovascular	70	3,4	m	240,4	41,89	198,5	0,174	2,38	1,57	0,32
9	Desconocido	70	9,0	m	105,00	18,48	86,52	0,176	2,26	1,5	3,12
10	Nefropatía diabética	65	7,0	m	1301,00	445,30	855,7	0,342	2,53	2,23	1,74
11	GN membranacea	45	5,4	f	311,80	24,44	287,4	0,078	1,57	2,06	0,52
12	GN membrano-	52	1,5	m	144,10	19,24	124,9	0,134	1,87	0,73	0,17

	proliferativa (Tipo 1)										
13	Nefropatía hipertensiva	61	4,1	m	73,45	15,9 2	57,5 3	0,217	2,15	2,35	0,67
14	ADPKD	57	1,2	m	281,9	44,0 2	237,9	0,156	2,18	1,35	13,4
15	Nefropatía diabética	73	4,0	m	116,9	19,7 3	97,1 7	0,169	2,38	1,66	4
16	GN mesangio-proliferativa	69	8,1	m	70,81	18,5 1	52,3	0,261	2,62	2,28	6,7
17	Nefritis intersticial	61	2,6	f	76,28	11,2 1	65,0 7	0,147	2,21	1,61	2,9
18	Desconocido	56	10,6	m	487,1	76,1 2	411	0,156	2,35	2,41	0,17

5 Para la preparación de la muestra, alícuotas de 100 µL de la suspensión con anticuerpo de conformación oxPTH monoclonal (oxPTH-ConforMAB) inmovilizado se usaron para rellenar columnas MobiSpin equilibradas con tampón PBS, pH 7,4. Entonces se aplicaron 500 µL de cada muestra en la columna, respectivamente. Las columnas se incubaron mezclando de extremo a extremo durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron con 250 µL de tampón de acetato de amonio 0,1 M a pH 7,0, seguido de un lavado con 250 µL de tampón de acetato de amonio 0,1 M a pH 7,0 que contenía 20% de acetonitrilo, y entonces se eluyó dos veces con 200 µL de tampón de elución (ácido fórmico 0,05 M, pH 3,5). El flujo continuo, las fracciones de lavado, así como el eluido de la columna se recogieron por separado y se liofilizaron. Las muestras fueron reconstituidas en 500 µL de tampón PBS, pH 7,4 y alícuotas analizadas mediante el PTH ECLIA intacto de Roche (Elecsys® PTH, ensayo intacto, Roche, Penzberg, Alemania). La Tabla 2 muestra las características clínicas básicas y los datos de laboratorio de los pacientes estudiados en diálisis, así como las concentraciones de iPTH medida directamente (ng/L) y después de la eliminación de la PTH oxidada y mal plegada (iPTH real).

15 Los resultados se resumen en la Figura 6. Las barras oscuras (azules) muestran concentraciones de PTH en suero determinadas directamente mediante PTH ECLIA intacta convencional de Roche. Cuando las formas oxidadas de PTH se eliminaron de la muestra, las concentraciones de PTH medidas fueron completamente diferentes (barras grises/rojas). Mientras que las concentraciones de PTH medidas fueron sustancialmente más bajas después de la inmunosorción y la eliminación de las formas de PTH oxidada, la relación entre las concentraciones de PTH medidas directamente y las concentraciones de PTH después de la eliminación de las formas de PTH oxidadas varió de forma elevada entre los pacientes. En algunos pacientes solo el 7% de la PTH medida directamente estaba libre de oxidación y plegado defectuoso, mientras que, en otros pacientes, el 34% de la PTH medida directamente era PTH intacta. Por lo tanto, los datos muestran una sorprendente variación de la hormona paratiroidea de oxidada a biológicamente activa en nuestros pacientes, posiblemente de acuerdo con la exposición a estrés oxidativo entre los pacientes estudiados, la cantidad de ROS presentes, la actividad de la metionina sulfo reductasa tipo A o el potencial reductor en la sangre y la circulación.

Controles

30 Para determinar la recuperación, en una serie independiente de mediciones 500 µL de cada muestra se enriquecieron con 1 ng de hPTH(aa 1-84) oxidada del ejemplo 1. Las muestras enriquecidas se trataron como se describe en la parte de preparación de muestras. El enriquecimiento no tuvo impacto en el valor de PTH medido cuando la PTH oxidada y sus fragmentos se eliminaron como se ha descrito. La recuperación de la PTH(aa 1-84) oxidada añadida estuvo en el rango de 65 a 105%, si se determinó directamente por el iPTH ECLIA.

35 Para asegurarse de que las columnas oxPTH eliminen la PTH oxidada específicamente, analizamos algunas muestras después de la purificación con una columna capaz de unir 1,25-dihidroxitamina D₃. Más precisamente, aplicamos muestras de suero a columnas de afinidad que comprenden anticuerpo monoclonal de unión a 1,25-dihidroxi vitamina D₃ (Art. No. K1107-737, Immundagnostik AG, Bensheim, DE). Un tratamiento con una columna de este tipo tuvo poco impacto en la concentración de PTH medida como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

IPTH NG/L	IPTH POST COLUMNA VIT. D (NG/L)	RELACIÓN
43,63	32,43	0,74
796,2	684,83	0,86

52,84	47,45	0,89
46,49	41,86	0,90
70,6	61,99	0,87

Los datos de la Tabla 3 muestran que la unión no específica de PTH representó aproximadamente el 14% para una columna de inmunosorción que comprende un anticuerpo no específico. Además, la unión no específica de PTH fue en todas las muestras aproximadamente la misma, de modo que la columna de afinidad por sí sola no influyó significativamente en las mediciones de PTH a excepción de una pérdida típica de recuperación. En otras palabras, la columna por sí sola no influyó significativamente en los resultados.

Para descartar que el anticuerpo de conformación oxPTH monoclonal MAB probado se libere de la columna e interfiera en la cuantificación de PTH en la iPTH ECLIA de Roche, se añadió anticuerpo de conformación de oxPTH monoclonal (MAB) libre a muestras de dos pacientes en una concentración final de 1,8 µg MAB por mL. Las muestras fueron analizadas entonces utilizando el inmunoensayo para iPTH. Aquellas muestras donde solo se agregó solvente tuvieron concentraciones medidas de iPTH de 43,63 [ng/L] (paciente a) y 796,20 [ng/L] (paciente b), respectivamente. La adición de los anticuerpos monoclonales a las muestras no alteró significativamente los resultados. En las muestras con anticuerpos medimos 35,70 [ng/L] (paciente a) y 753,20 [ng/L] (paciente b). Así, incluso si los anticuerpos monoclonales (MAB) contra la PTH humana oxidada se liberaran, estos anticuerpos no interfieren significativamente en la cuantificación final de iPTH.

Datos clínicos

Las características clínicas se muestran en la Tabla 2. Se incluyeron 17 pacientes en hemodiálisis crónica, así como un paciente que requería diálisis debido a insuficiencia renal aguda. Analizamos las muestras clínicas con el inmunoensayo iPTH. En todos los pacientes las concentraciones de PTH medidas fueron sustancialmente más bajas cuando se consideraron formas oxidadas de hormona paratiroidea (véase la Tabla 2 y la Figura 6). Sin embargo, es de destacar que la relación entre las concentraciones de PTH determinada directamente con el inmunoensayo de la iPTH y aquellas concentraciones medidas después de la eliminación de las formas de PTH oxidada no es constante; en contraste, la relación varía sustancialmente, probablemente debido al diferente grado de estrés oxidativo entre los pacientes estudiados. En algunos pacientes solo el 7% de la PTH medida tradicionalmente estaba libre de oxidación, mientras que en otro paciente el 34% de la PTH medida tradicionalmente era PTH intacta real. Tomado en conjunto, sin considerar el estado de oxidación de la PTH, las concentraciones de PTH medidas convencionalmente utilizando un sistema de detección de sándwich moderno se detectan varias veces más elevadas que las concentraciones cuando se considera la oxidación de PTH. El efecto de la oxidación de la PTH es muy variable entre estos pacientes que requieren diálisis. Solo existe una correlación muy débil entre la PTH medida tradicionalmente y la PTH oxidada.

En algunos pacientes utilizamos junto al inmunoensayo para iPTH de Roche también el sistema de ensayo para PTH(1-84) de Roche. Básicamente obtuvimos resultados similares a los descritos anteriormente con el sistema de análisis iPTH. Sin considerar el estado de oxidación de la PTH, las concentraciones de PTH medidas tradicionalmente fueron varias veces más altas en comparación con las concentraciones que tienen en cuenta la oxidación de la PTH.

Usando métodos de espectroscopía de masas muy sensibles, el estudio actual demostró que la oxidación de la PTH(1-84) humana da como resultado la formación de una variedad de productos correspondientes a los diferentes residuos de metionina oxidada en la posición 8 y/o 18 de la hormona paratiroidea. Una columna con el anticuerpo monoclonal (MAB) generado contra el fragmento de hPTH(1-34)ox es específica para todas las formas oxidadas de hPTH(1-84) y las eliminó por completo de la muestra. La parte clínica de nuestro estudio demostró que, sin tener en cuenta el estado de oxidación de la PTH, las concentraciones de PTH medidas tradicionalmente basadas en los métodos estándar actuales resultaron en concentraciones de PTH mucho más elevadas en las muestras clínicas en comparación con las concentraciones cuando se considera la oxidación de la PTH. El efecto de la oxidación de la PTH es altamente variable entre los pacientes que requieren diálisis. Solo existe una correlación muy débil entre la PTH medida tradicionalmente y los datos de PTH considerando la oxidación de esta hormona. Dado que la PTH oxidada (Figura 1) ya no estimula el receptor de PTH para generar cAMP y, por lo tanto, es más que probable que sea biológicamente inactiva, las estrategias clínicas para el tratamiento del hiperparatiroidismo de pacientes en diálisis basadas en mediciones de PTH utilizando el ELISA clásico en sándwich de tercera generación son más propensas a una toma de decisiones incorrectas.

Se sabe, por ejemplo, que en pacientes urémicos los ensayos altamente específicos han medido un aumento de 2,5 veces en la fracción no suprimible de la PTH en comparación con sujetos sanos. Además, las concentraciones de PTH medidas en el suero urémico aparentemente sobreestimaron las anomalías óseas relacionadas con la PTH también por un factor de 2-2,5. Se sugirió que, en pacientes con insuficiencia renal crónica, la presencia de elevados niveles circulantes de fragmentos de PTH no (1-84) (muy probablemente PTH 7-84) detectados por el ensayo de segunda generación y los efectos antagónicos de PTH 7-84 en la actividad biológica de PTH 1-84 pueden explicar esto. Sin embargo, esta hipótesis nunca fue probada en estudios clínicos adecuadamente diseñados utilizando, por ejemplo,

HPLC acoplado a espectrometría de masas para distinguir realmente entre diferentes fragmentos de PTH. Nuestros datos, por otro lado, utilizando la cromatografía líquida moderna ligada a espectroscopia de masas en tándem para detectar la PTH, sugieren que esta sobrestimación bien conocida de la PTH en pacientes en diálisis podría deberse a la presencia de formas oxidadas, biológicamente inactivas de la PTH en pacientes en diálisis.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o el ácido hipocloroso (HOCl), y los radicales libres, como el radical hidroxilo (OH) u otros, se forman continuamente in vivo. El desequilibrio adicional entre la formación de ROS y el potente mecanismo de defensa antioxidante crea estrés oxidativo. La uremia, en general, se asocia con un aumento del estrés oxidativo, y la hemodiálisis o la diálisis peritoneal pueden contribuir, en particular, al estrés oxidativo y reducir los niveles de antioxidantes en dichos pacientes.

Uno de los objetivos preferidos altamente sensibles para la oxidación es la metionina. El producto de oxidación sulfóxido de metionina se puede revertir mediante reducción con sustancias químicas o enzimáticamente, mientras que la oxidación a la sulfona de metionina es irreversible desde el punto de vista biológico. La oxidación de los residuos de metionina puede conducir a una activación o inactivación de una proteína funcional, respectivamente, y el sulfóxido de metionina resultante puede revertirse enzimáticamente por una reductasa específica. Se ha encontrado metionil sulfóxido reductasa en *E. coli* y en tejidos de mamíferos. La oxidación de la metionina y su reversión pueden servir como un regulador de las actividades de las proteínas. La hormona paratiroidea contiene dos residuos de metionina en la región amino-terminal (posiciones 8 y 18), responsables de la actividad biológica del péptido, accesibles a alteraciones debido a oxidación. La estructura secundaria de la hormona paratiroidea parece ser esencial para su unión al receptor. El residuo de metionina 8 es importante para el plegamiento de la hormona y demuestra el papel clave de este residuo en la estructura del dominio amino-terminal y su actividad biológica. De este modo, la oxidación del residuo de metionina 8, que produce cambios esenciales en la estructura secundaria de la PTH, está implicada tanto en la unión como en la activación de la adenilil ciclasa.

En base a los datos publicados y a nuestros resultados, sugerimos que los residuos de metionina en diferentes hormonas peptídicas, como la hormona de crecimiento humana, somatomammotropina, luteotropina y PTH pueden estar sujetos a la oxidación que resulta en la pérdida de actividad biológica o afinidad al receptor. La oxidación de metionina puede ser un principio general en la regulación de la actividad hormonal. Sin embargo, esta hipótesis ha de ser probada en detalle.

Nuestro nuevo sistema de ensayo es, por primera vez, capaz de diferenciar entre formas oxidadas y no oxidadas de PTH mediante la eliminación de fragmentos de PTH oxidada con un anticuerpo altamente específico capaz de detectar y unirse a todas las formas de PTH oxidada. La eliminación de las formas oxidadas de PTH se puede realizar - como se hizo en el presente estudio - antes del análisis mediante una columna recubierta seguida de un análisis de PTH de tercera generación (para el principio de ensayo, ver figura 6) o incluso como parte integrante de un sistema ELISA sándwich de tercera generación. También debería ser factible combinar nuestro enfoque con técnicas modernas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC MS/MS) en la práctica clínica en un futuro próximo mediante inmunocaptura de fragmentos de PTH oxidada antes de la LC-MS/MS. Esto mejorará el rendimiento de diagnóstico de los métodos de LCMS/MS PTH.

En conclusión, mediante nanoLC-ESI-FT-MS pudimos demostrar que la oxidación de PTH(1-84) humana resultó en la formación de una variedad de productos correspondientes a los diferentes residuos de metionina oxidada en la posición 8 y/o 18 de la hormona paratiroidea. Seleccionamos un anticuerpo monoclonal de conformación contra un determinante antigénico común de la hormona paratiroidea humana oxidada y sus fragmentos oxidados y encontramos una específica para todas las formas oxidadas de hPTH(1-84) que permite la eliminación de la hormona paratiroidea oxidada y sus fragmentos de las muestras de suero de pacientes humanos. También describimos aquí que las concentraciones de PTH medidas tradicionalmente según los métodos de referencia actuales, que no tienen en cuenta el estado de oxidación de la PTH, dieron como resultado concentraciones de PTH mucho más altas en especímenes de muestras clínicas en comparación con las concentraciones cuando se considera la oxidación de la PTH. El efecto de la oxidación de la PTH es además altamente variable entre los pacientes que requieren diálisis. Dado el impacto de la calcificación vascular en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal con respecto a la morbilidad y la mortalidad, los resultados actuales respaldan que la medición de la PTH total sin "contaminación" de las formas de PTH oxidada mejorará en gran medida la toma de decisiones clínicas con respecto a las anomalías óseas y cardiovasculares relacionadas con la PTH.

Conclusiones

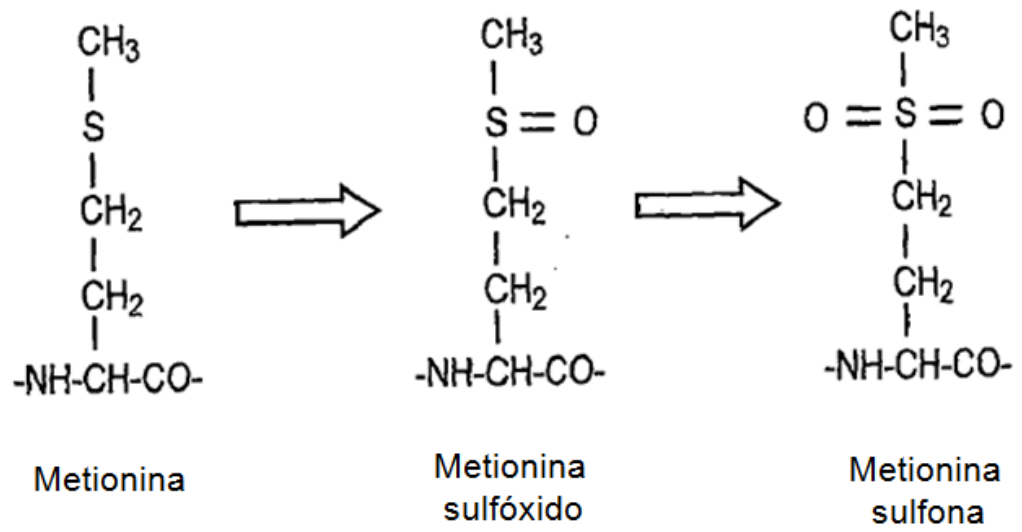
Por lo tanto, la presente solicitud proporciona la divulgación de un método para obtener moléculas de anticuerpos específicas para la hormona paratiroidea humana inactivada oxidativamente y sus fragmentos circulantes, que comprende un paso de obtener anticuerpos contra el péptido de la hormona paratiroidea humana mediante la inmunización de un animal no humano con un inmunógeno que comprende como hapteno de hPTH un péptido de hPTH oxidado en las posiciones 8, 18 o ambas, o un fragmento respectivo del mismo, y recuperar dichos anticuerpos

- 5 de dicho animal no humano; un paso de seleccionar o purificar dichos anticuerpos de entre moléculas de anticuerpo que se unen al péptido de la hormona paratiroidea humana bioactiva en condiciones fisiológicas para obtener anticuerpos que se unen específicamente al péptido de hPTH oxidada o a sus respectivos fragmentos circulantes; un paso de seleccionar o purificar dichos anticuerpos específicos para el péptido de hPTH oxidada de entre moléculas de anticuerpo que se unen a una secuencia de aminoácidos de hPTH (estructura primaria de la proteína) que comprende en las posiciones 8, 18 o ambas, metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona, para obtener moléculas de anticuerpo que tienen una región determinante complementaria que se une específicamente a un epítipo conformacional (estructura terciaria de la proteína) común a péptidos de la hormona paratiroidea humana oxidada inactiva y sus fragmentos circulantes.
- 10 Las moléculas de anticuerpo además pueden purificarse o seleccionarse mediante un paso en el que se analizan aún más para determinar su unión a una estructura de hPTH primaria que comprende un triptófano oxidado en la posición 22 o cuya estructura de hPTH carece de los aminoácidos del extremo aminoterminal en las posiciones 1 y 2 o ambas de la secuencia hPTH.
- 15 Los anticuerpos sometidos a estos pasos de selección o purificación pueden ser anticuerpos monoclonales producidos por clones de células de ratón o rata. Un experto en la materia apreciará que los anticuerpos para la criba y la selección también pueden ser moléculas de anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena sencilla de una biblioteca de anticuerpos sintéticos. Si los anticuerpos se recuperan de un animal no humano, el inmunógeno para generar estos anticuerpos es preferiblemente una proteína portadora que tiene unido como hapteno hormona paratiroidea humana sintética oxidada, fragmento de la hormona paratiroidea humana sintética oxidada o péptido oxidado sintético que comprende la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de la hormona paratiroidea humana o una porción sustancial, fragmento o variante de la misma.
- 20
- 25 Otras realizaciones preferidas y el alcance de la presente invención se señalan en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener moléculas de anticuerpos monoclonales específicos para el péptido de la hormona paratiroidea humana (hPTH) inactivada oxidativamente y sus fragmentos en circulación, que comprende
 - 5 a) obtener anticuerpos contra el péptido de la hormona paratiroidea humana mediante la inmunización de un animal no humano con un inmunógeno que comprende como hapteno la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de la hormona paratiroidea oxidada en la metionina 8, 18 o ambas, para obtener o aislar moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional (estructura terciaria de la proteína) de péptidos de la hormona paratiroidea humana inactivada oxidativamente y sus fragmentos circulantes, de modo que las moléculas de anticuerpos obtenidas se unen a un péptido de hPTH inactivada oxidativamente independiente de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en posiciones 8, 18 o ambos.
 - 10 b) seleccionar o purificar dichos anticuerpos de entre moléculas de anticuerpos que se unen al péptido de la hormona paratiroidea humana bioactivo en condiciones fisiológicas para obtener anticuerpos que reconozcan específicamente la hormona paratiroidea inactivada oxidativamente o sus fragmentos;
 - 15 c) seleccionar o purificar dichos anticuerpos contra la hormona paratiroidea oxidada de entre anticuerpos que se unen a un péptido hPTH inactivado oxidativamente independiente de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en las posiciones 8, 18 o ambas, para obtener o aislar moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional (estructura terciaria de la proteína) de péptidos de la hormona paratiroidea humana inactivada oxidativamente y sus fragmentos circulantes, de modo que las moléculas de anticuerpos obtenidas se unen a un péptido de hPTH inactivada oxidativamente independiente de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en posiciones 8, 18 o ambos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además una selección o purificación de dichas moléculas de anticuerpo por su unión a una secuencia de aminoácidos de hPTH (estructura primaria de la proteína) que comprende un triptófano oxidado en la posición 22 o una secuencia de aminoácidos de hPTH que carece de los aminoácidos del extremo aminoterminal en las posiciones 1 o 2 o ambas.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dichos anticuerpos se obtienen a partir de clones de células productoras de anticuerpos, clones de células B de rata o ratón.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dichos anticuerpos son anticuerpos recombinantes, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena sencilla expresados por clones de una biblioteca de anticuerpos sintéticos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que los anticuerpos se purifican o se seleccionan mediante cromatografía de afinidad usando fragmentos de péptido de hPTH sintética oxidada ligados a una fase sólida o una molécula marcadora.
- 635 El método de cualquier reivindicación 1 a 5, en el que el epítipo conformacional está formado por la secuencia de aminoácidos 3 a 34 de la hormona paratiroidea humana.
7. Un material de unión para eliminar la hormona paratiroidea humana inactivada oxidativamente de una muestra de prueba, dicho material de unión que tiene anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos monoclonales de cadena sencilla contra la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de la hormona paratiroidea humana oxidada en las metioninas 8, 18 o ambas, unidos a una fase sólida, dichas moléculas de anticuerpo que se unen a un péptido de hPTH inactivado oxidativamente independiente de la metionina R-sulfóxido, metionina L-sulfóxido o metionina sulfona en las posiciones 8, 18 o ambas, y dichas moléculas de anticuerpo que se unen específicamente a un epítipo conformacional de péptidos de la hormona paratiroidea humana inactivada oxidativamente y sus fragmentos circulantes.
8. Un material de unión como se describe en la reivindicación 7, que está en forma de una suspensión,
9. Un método de medición de la concentración de hormona paratiroidea humana en una muestra de un fluido corporal, que comprende el paso de una primera muestra en contacto de la muestra con una fase sólida o una suspensión como se describe en las reivindicaciones 7 u 8, y medir la concentración de hormona paratiroidea en el flujo o el sobrenadante.
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además el paso de medir la concentración de hormona paratiroidea mediante un inmunoensayo de dos sitios, en el que uno de los dos anticuerpos se une en la porción aminoterminal con los aminoácidos 1 a 34 de la hormona paratiroidea.
11. El método de la reivindicación 9, que comprende además el paso de medir la concentración de fragmentos de hormona paratiroidea mediante espectroscopia de masas en tándem.
- 60 12. Uso de un material de unión como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 en un método para la determinación *in vitro* del hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia renal o ambos.

FIG. 1A



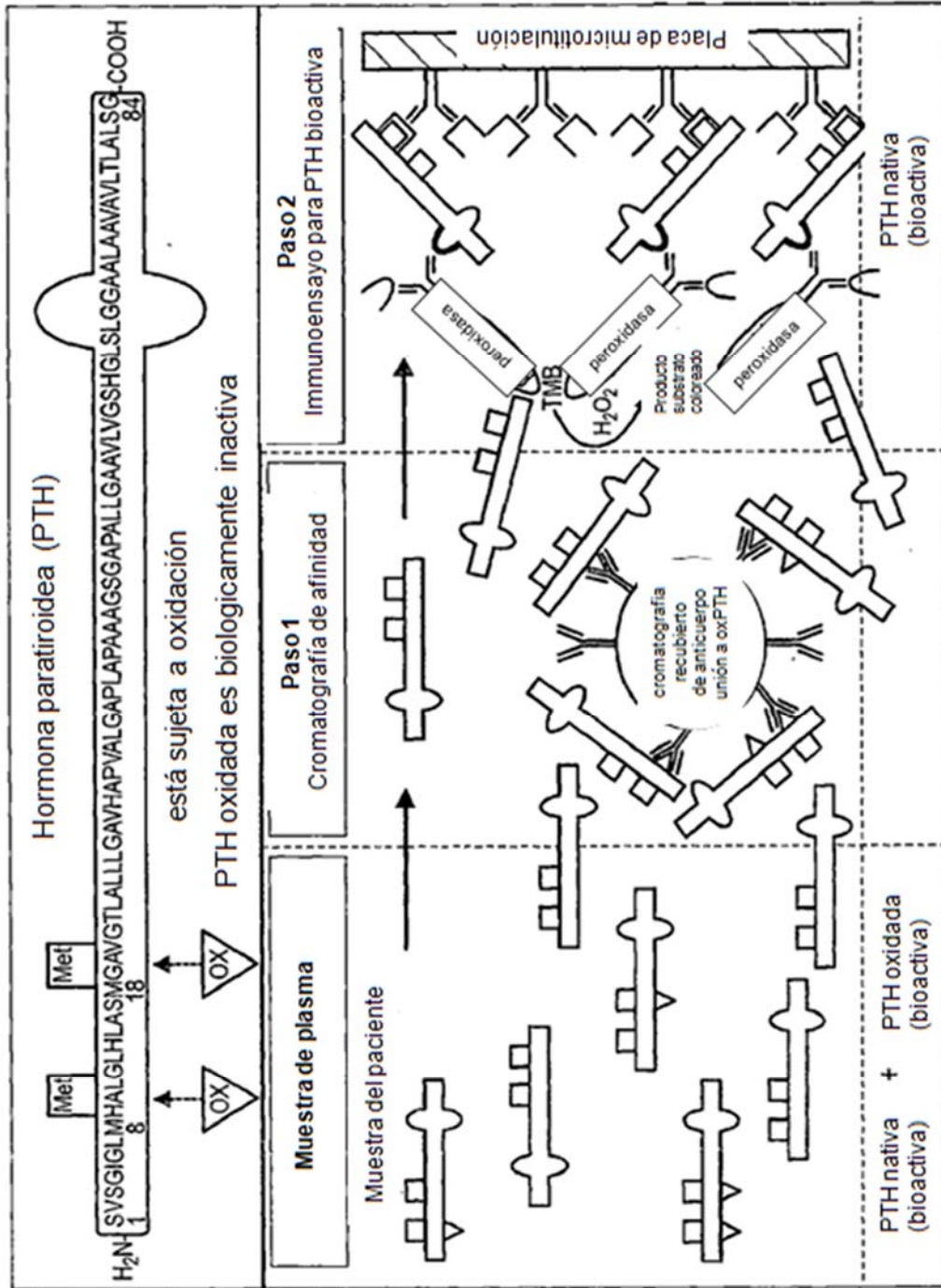


FIG. 1B

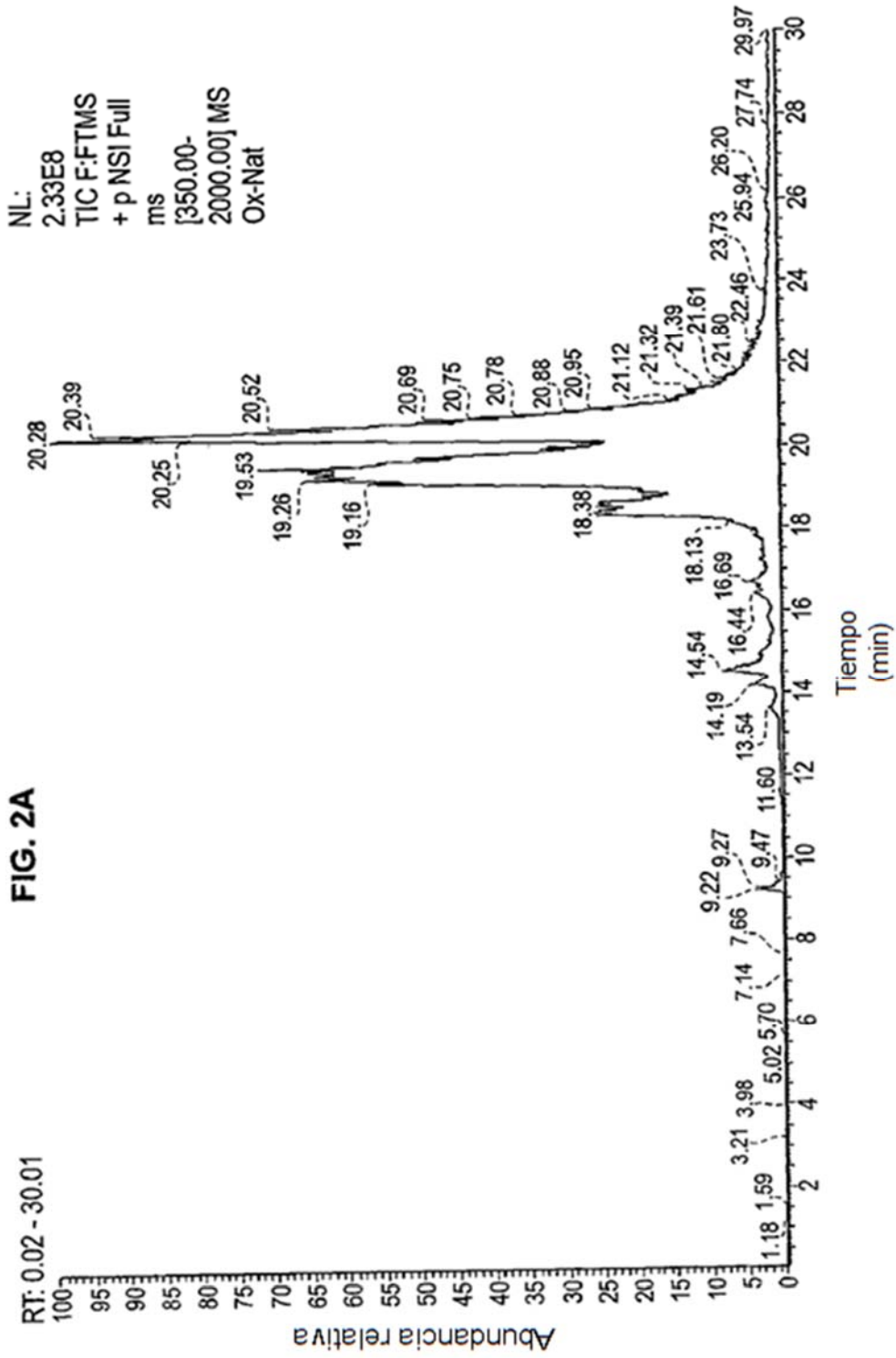


FIG. 2B

Ox-Na#1364-1668 RT: 18.30-20.50 AV: 127 NL: 1.91E5
F: FTMS + p NSI Full ms [350.00-2000.00]

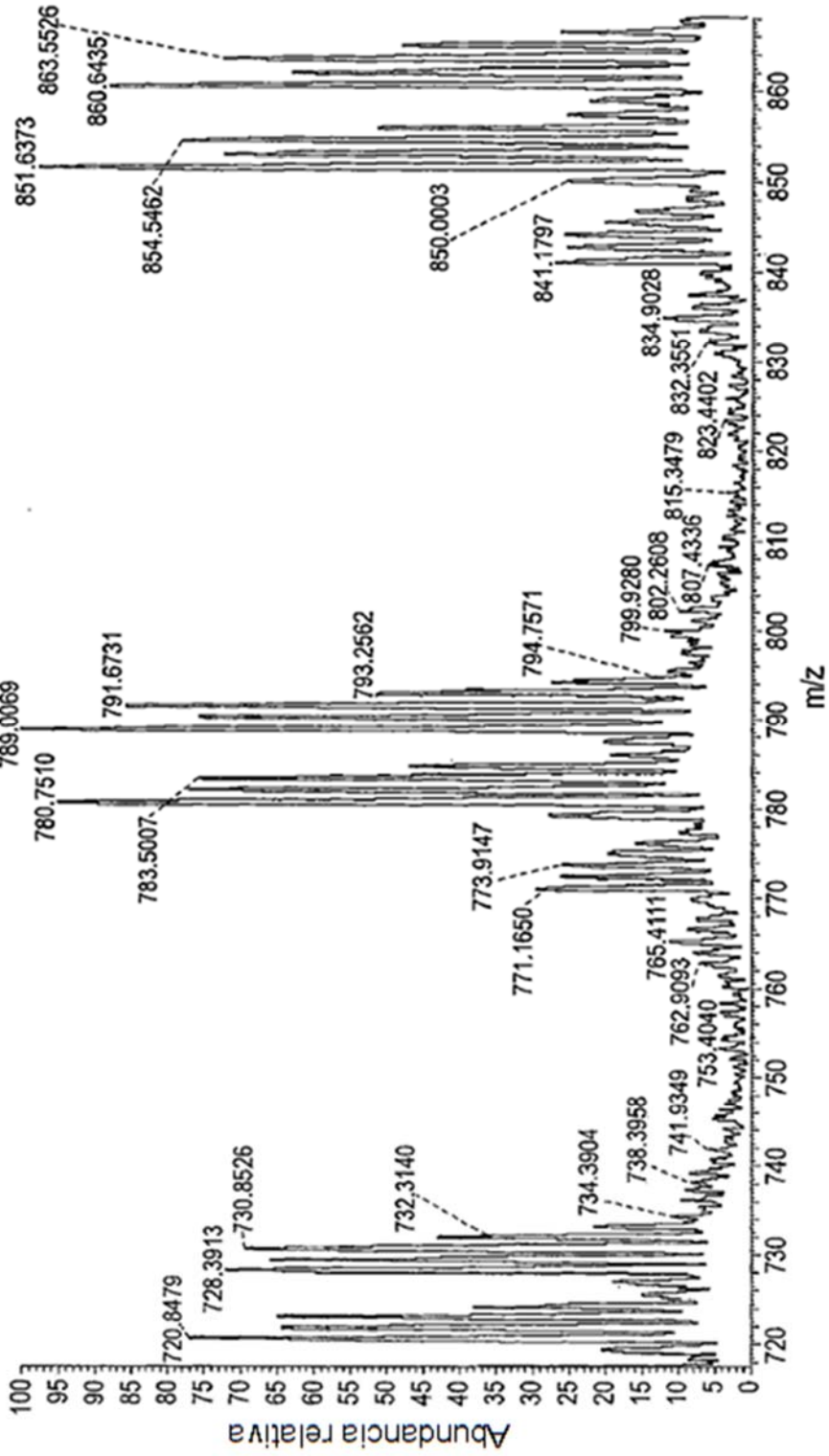


FIG. 3A

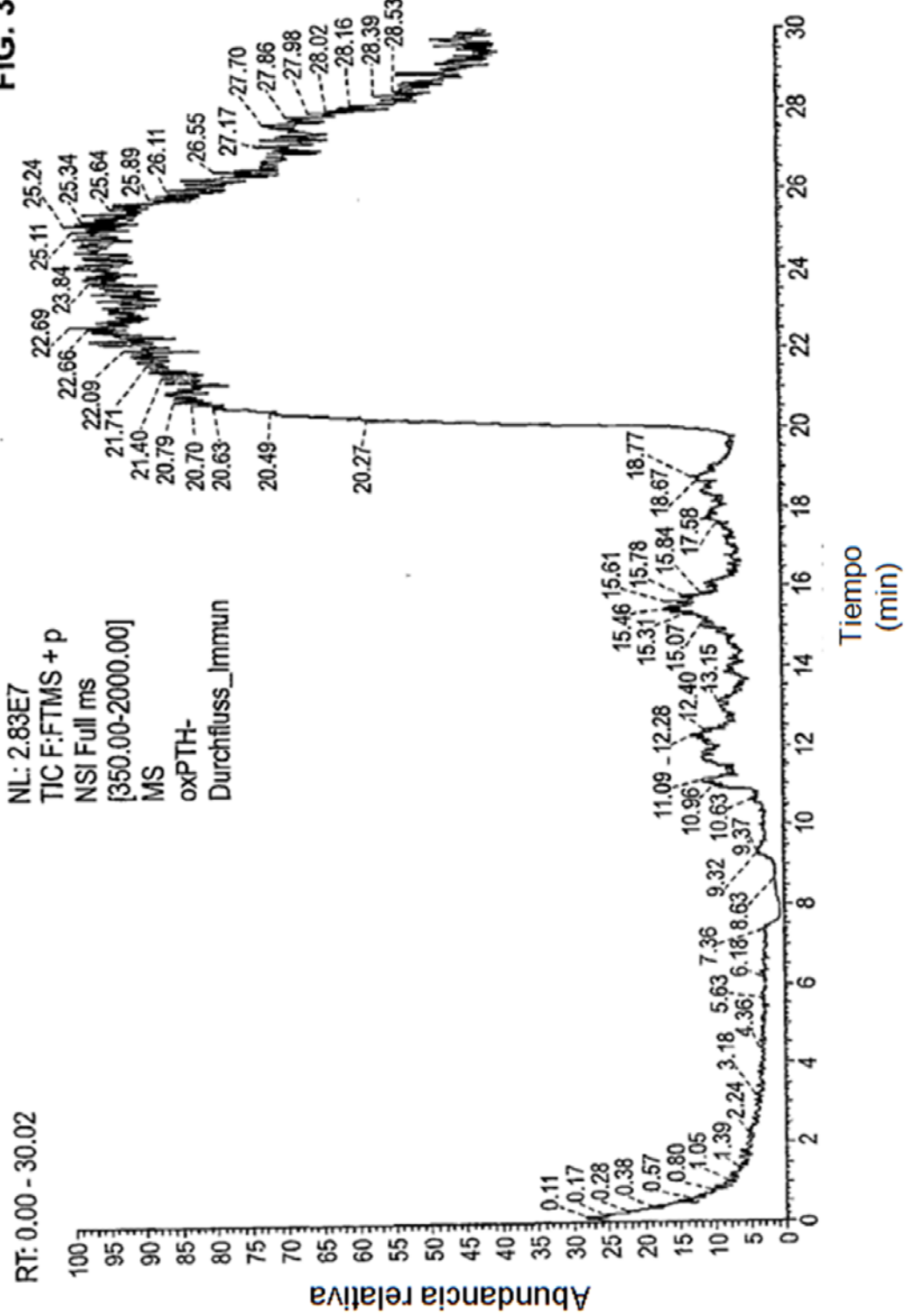
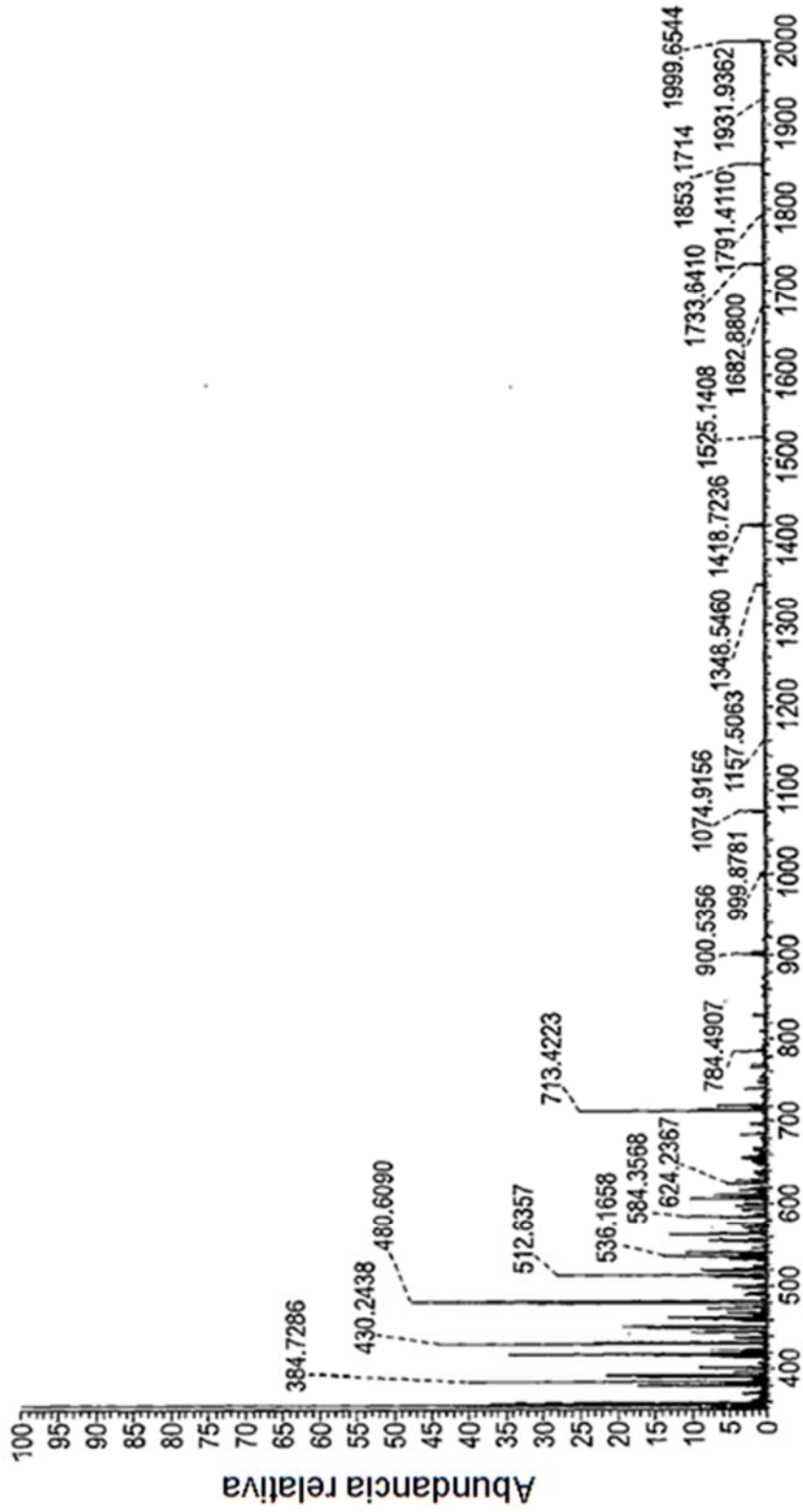


FIG. 3B

oxPTH-Durchfluss_Immune#1224-1436 RT: 16.51-18.50 AV: 99 NL: 1.09E5
F: FTMS + p NSI Full ms [350.00-2000.00]



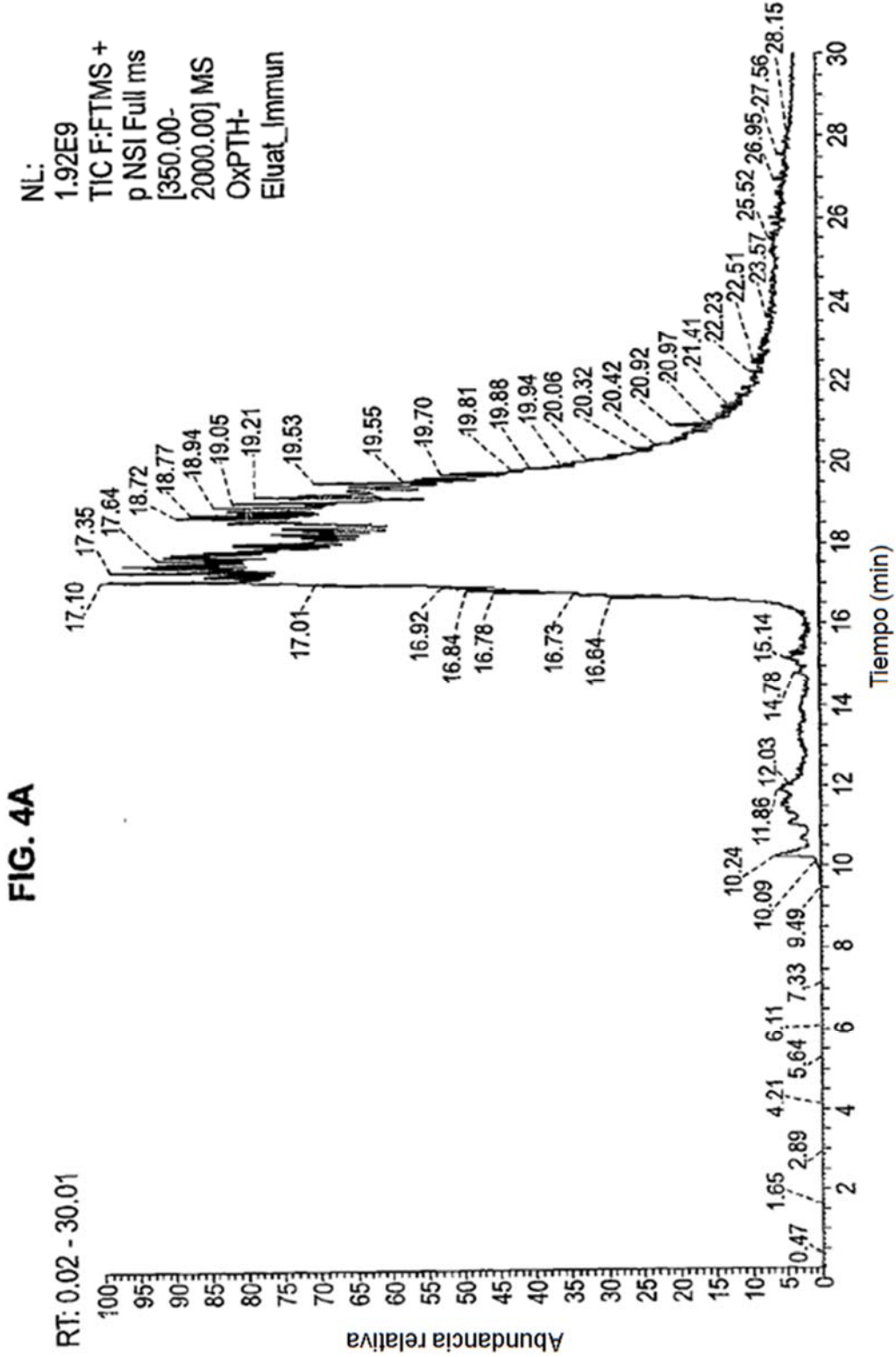


FIG. 4B

OxPTH-Eluat_immun#1335-1592 RT: 16.50-18.50 AV: 121 NL: 3.55E6
F: FTMS + p NSI Full ms [350.00-2000.00]

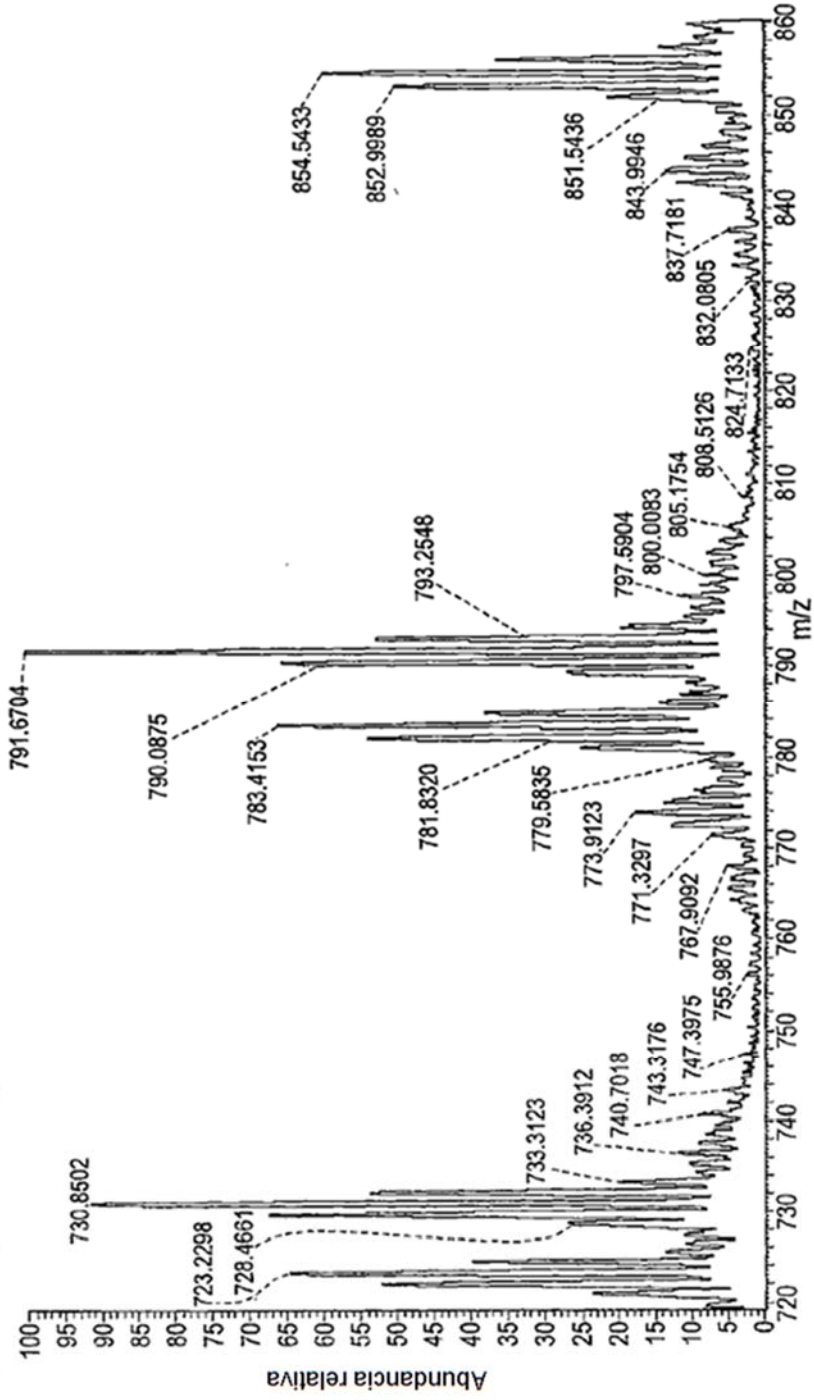
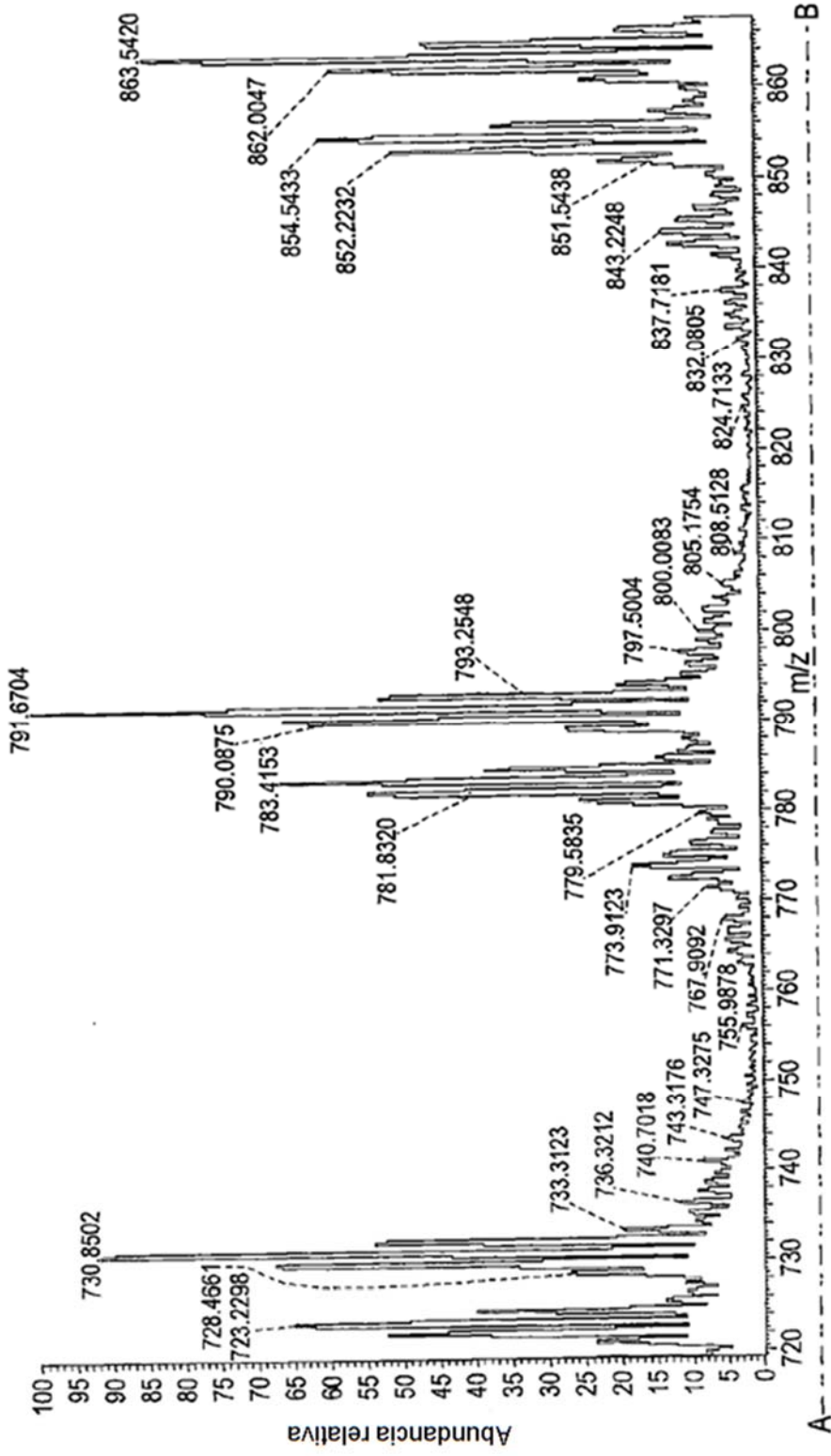
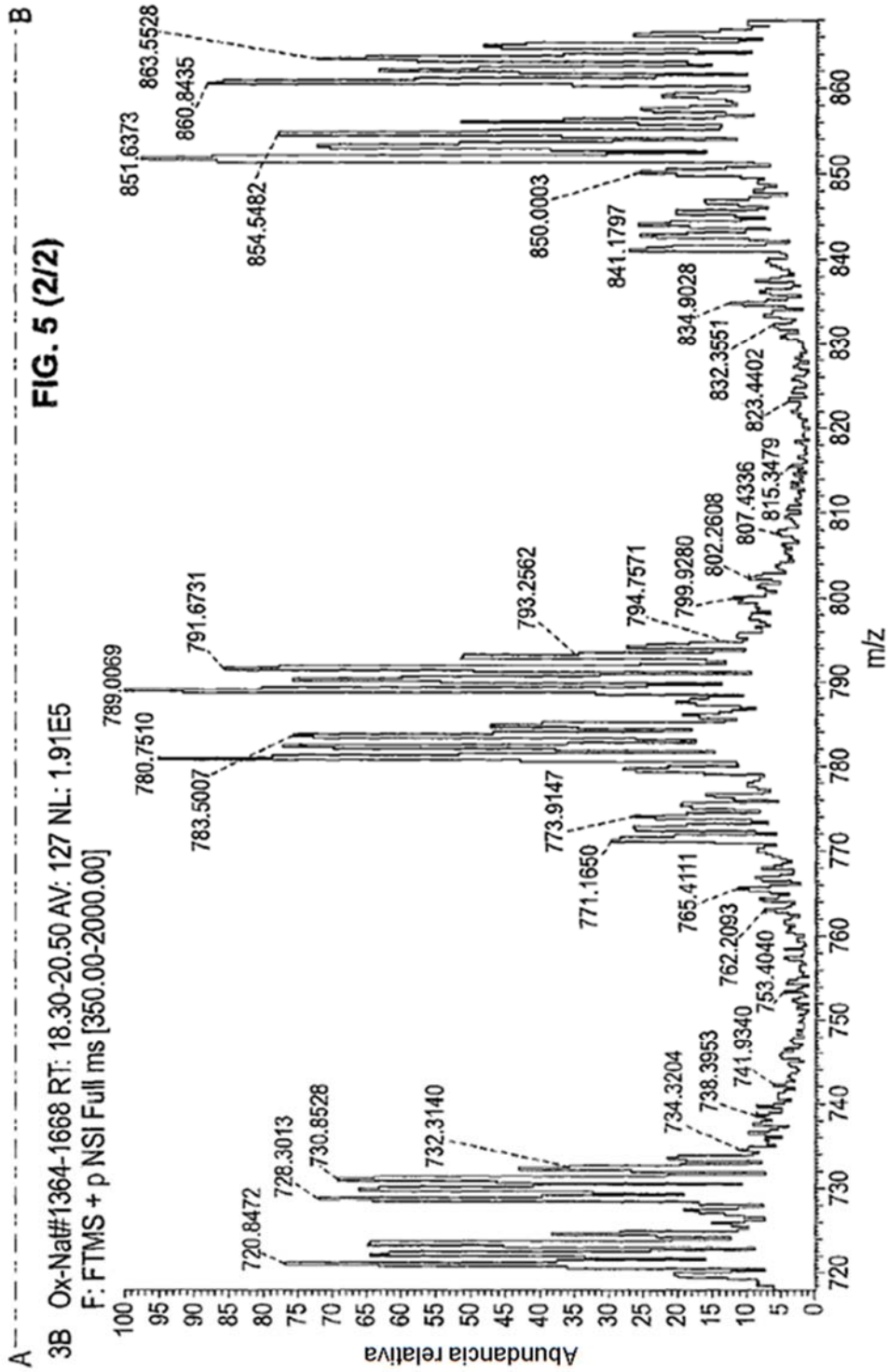


FIG. 5 (1/2)

1B OXPTH-Eluat_Immun#1336-1622 RT: 16.50-18.50 AV: 121 NL: 3.55E6
F: FTMS + p NSI Full ms [350.00-2000.00]





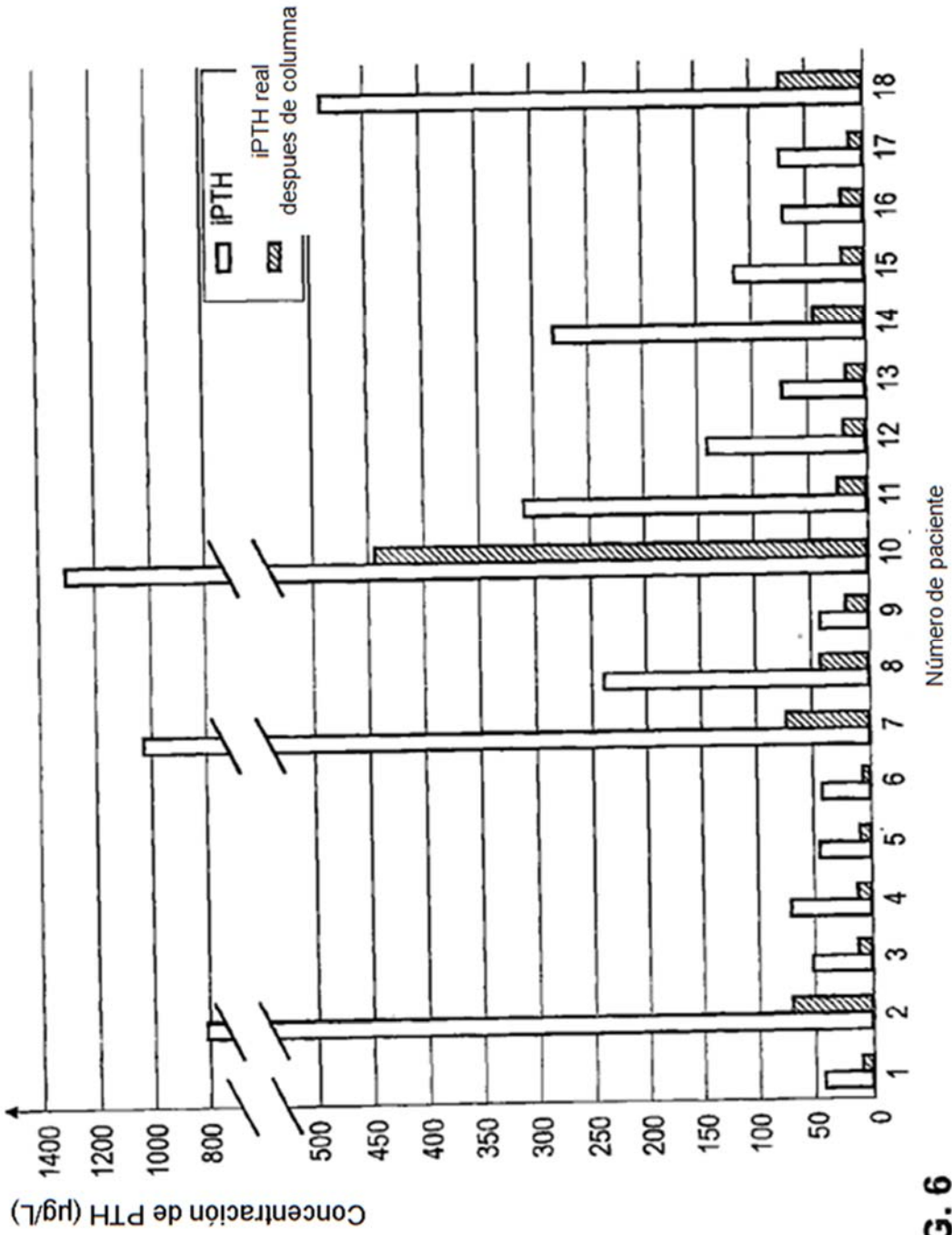


FIG. 6