



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 308 353**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05018249 .2**

(96) Fecha de presentación : **23.08.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1630175**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

(54) Título: **Anticuerpos dirigidos contra el polimorfismo de Marburg I de la proteasa activadora del factor VII (FASP), su producción y su uso.**

(30) Prioridad: **24.08.2004 DE 10 2004 041 104
06.06.2005 DE 10 2005 026 163**

(73) Titular/es:
**Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Görzhäuser Hof Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(72) Inventor/es: **Althaus, Harald;
Schwarz, Herbert;
Fischer, Bodo y
Wissel, Thomas**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 dirigidos contra el polimorfismo de Marburg I de la proteasa activadora del factor VII (FSAP), su producción y su uso.

5 El invento se refiere a anticuerpos dirigidos contra el polimorfismo de Marburg I de la proteasa activadora del factor de coagulación de la sangre VII (FSAP), a su producción y a su utilización.

10 La proteasa activadora del factor VII (FSAP) es una serina-proteasa plasmática, que, junto a su propiedad de activar al factor de coagulación de la sangre VII, dispone además de unas propiedades de los activadores del plasminógeno, es decir, unas propiedades activadoras de la prourocinasa [Roemisch y colaboradores (1999). Haemostasis 76: 292-299; documento de solicitud de patente europea EP 952.215 A2]. Esto apunta a que la FSAP desempeña un cometido tanto en la cascada de coagulación de la sangre como también en el sistema de la fibrinólisis.

15 La FSAP se presenta en un plasma humano en una concentración de aproximadamente 12 µg/ml y puede ser transformada a través de una autocatálisis desde la proenzima monocatenaria en la proteasa bicatenaria activa. Junto a la secuencia de tipo salvaje del gen de la FSAP humana, se conocen diferentes polimorfismos de nucleótidos, que en dos casos conducen también a una modificación de la secuencia de aminoácidos (documento EP 1.182.258 A1). El denominado polimorfismo de Marburg I (también llamado mutación, alelo o variante de MR I) conduce a un intercambio de aminoácidos Gly/Glu en la posición 534 de la proenzima inclusive el péptido de señal (Gly/Glu 534) y da como resultado una disminución en un 50-80% de la actividad de activación de la prourocinasa, mientras que la capacidad del factor VII para activar permanece inalterada. Otro polimorfismo, el denominado polimorfismo de Marburg II (también llamado mutación, alelo o variante de MR II) conduce a un intercambio de aminoácidos Glu/Gln en la posición 370 de la proenzima inclusive el péptido de señal (Glu/Gln 370). Sin embargo, la mutación de Marburg II 20 no tiene ninguna influencia sobre la actividad de activación de la prourocinasa que tiene la FSAP. Un polimorfismo de MR I se presenta aproximadamente en un 5% de la población de Europa Occidental. Los portadores heterocigóticos del polimorfismo MR I parecen llevar un riesgo, más alto en comparación con el promedio de la población, de desarrollar una estenosis de la carótida [Willeit y colaboradores (2003) Circulation 107: 667-670]. Por consiguiente, la FSAP o respectivamente la variante de MR I de la FSAP constituye un marcador potencial para el reconocimiento de una 25 disposición a enfermedades arterioscleróticas.

30 La identificación de personas, que llevan por lo menos una copia de la variante de MR I de la FSAP, es posible de acuerdo con el estado de la técnica con ayuda de diferentes enfoques metodológicos (véanse los documentos EP 952.215 A2 y EP 1.182.258 A1). Uno de los métodos conocidos está basado en la determinación del potencial de 35 activación de la prourocinasa que tiene la FSAP en una muestra. Para esto, un anticuerpo específico, que no está en situación de diferenciar entre la FSAP de tipo salvaje y las variantes conocidas de la FSAP, se acopla a una fase sólida, y se incuba con el líquido de muestra. Después de haber añadido la prourocinasa y un substrato cromógeno, se determina la cantidad del cromógeno convertido como medida de la actividad de activación de la prourocinasa que tiene la FSAP. Los portadores del polimorfismo de Marburg I tienen una actividad de prourocinasa disminuida en un 50-80%. No 40 obstante, una actividad de prourocinasa disminuida puede ser debida también a una pequeña concentración de la FSAP en la muestra. Por lo tanto, es particularmente ventajoso determinar no sólo la actividad de la prourocinasa, sino adicionalmente también la concentración de los antígenos de la FSAP en una muestra. A partir del estado de la técnica se conocen dos anticuerpos monoclonales, que hacen posible la detección inmunológica de la FSAP. En el documento EP 1.182.258 A1 se han descrito dos anticuerpos monoclonales, que proceden de los linajes de células de hibridoma 45 DSM ACC2453 y respectivamente DSM ACC2454, que se habían obtenido después de la inmunización de ratones con la proteína de la FSAP. Ambos anticuerpos se fijan no sólo a la proteína de la FSAP de tipo salvaje, sino asimismo a las variantes de Marburg I y II. Otros conocidos anticuerpos contra la FSAP se fijan de igual manera a la FSAP de tipo salvaje así como también a las conocidas variantes mutantes, de tal manera que, por ejemplo, en un ensayo ELISA de emparedado (sándwich) se determina el contenido total de antígeno de la FSAP en una muestra (véase también el documento de solicitud de patente alemana DE 100.23.923 A1). Tan sólo cuando se comprueba una actividad de prourocinasa disminuida, en común con una concentración de antígenos de la FSAP en el intervalo normal, esto es 50 una indicación concreta acerca de la presencia de una variante de MR I de la FSAP.

No obstante, ninguno de los métodos descritos proporciona una demostración segura de la presencia de una variante de MR I de la FSAP. Sin embargo, con el fin de adoptar por ejemplo medidas profilácticas o terapéuticas planificadas para conseguir un objetivo en el caso de un disminuido potencial activador de la prourocinasa que tiene la FSAP, es absolutamente importante diagnosticar exactamente la causa original de la pérdida de la función.

55 La detección indudable del intercambio de aminoácidos Gly/Glu en la posición 534 de la proenzima (Gly/Glu 534) es posible hasta ahora solamente mediante la secuenciación de la correspondiente región codificadora en el ADN genómico o en el ARNm (mensajero). Un intercambio de bases G/A en la secuencia genómica, que se puede detectar en la posición de nucleótido 1.601 del ADNc, constituye la causa genética original para el polimorfismo de MR I de la FSAP (véase el documento EP 1.182.258 A1). Aún cuando el análisis de la secuencia de ADN proporciona resultados fiables, por parte de un laboratorio rutinario existe una necesidad de procedimientos de ensayo consagrados, que sean 60 lo más baratos, rápidos y seguros que resulten posibles, y que además se puedan realizar automáticamente en aparatos para diagnóstico ya existentes. Se prefieren predominantemente unos procedimientos de detección, o respectivamente unos análisis de ensayo, inmunológicos, puesto que ellos cumplen los criterios citados y han encontrado ya una amplia aplicación en el diagnóstico de laboratorio.

ES 2 308 353 T3

El presente invento estaba basado por lo tanto en la misión de poner a disposición un procedimiento o respectivamente unos componentes, que hagan posible la detección específica de la variante de MR I de la FSAP con ayuda de anticuerpos.

- 5 La solución del problema planteado por esta misión consiste en la puesta a disposición de los procedimientos y objetos conformes al invento, que se describen en las reivindicaciones.

En particular, el problema se resuelve mediante la puesta a disposición de unos anticuerpos, que se fijan específicamente a la variante de MR I de la FSAP, pero no a la proteína de la FSAP de tipo salvaje ni a otras variantes mutantes, 10 que no están caracterizadas por un intercambio de aminoácidos Gly/Glu en la posición 534 de la proenzima de la FSAP. Estos anticuerpos forman la base para la detección inmunológica directa y para la cuantificación de la variante de MR I de la FSAP en muestras de plasmas de portadores heterocigóticos o de individuos homocigóticos.

15 Sorprendentemente, se ha puesto de manifiesto que unos péptidos, que contienen por lo menos la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), que corresponde a los aminoácidos 532 hasta 536 de la variante de MR I de la FSAP, y que contienen, por consiguiente, el intercambio de aminoácidos Gly/Glu en la posición 534 de la proenzima (Gly/Glu 534), son especialmente adecuados como antígenos de inmunización para la producción de 20 anticuerpos específicos para la MR I de la FSAP. Los péptidos conformes al invento se distinguen por el hecho de que el resto Glu específico para la MR I de la FSAP en la posición 534 es flanqueado tanto en el terminal de N así como también en el terminal de C por lo menos por dos aminoácidos adicionales.

25 Sin embargo, se excluye expresamente del invento un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Thr-Lys-Lys-Leu-Ser-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Ile-Gly-Asp-Glu-Leu-Asp-Ser-Asn-Met, el cual se ha divulgado en una publicación de Shangary & Johnson [Shangary, S. & Johnson, D.E. (2002) Peptides derived from BH3 domaines of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x_L and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. (Péptidos derivados de dominios BH3 de miembros de la familia Bcl-2: Un análisis comparativo de la inhibición de la oligomerización de Bcl-2, Bcl-x_L y Bax, de la inducción de la liberación del citocromo c y de la activación de la muerte celular) Biochemistry 41, 9.485-9.495; página 9.487, Tabla 1]. Shangary & Johnson describen, aparte del citado péptido, todavía otros péptidos sintéticos procedentes del dominio BH3 30 de oncoproteínas de la familia Bcl-2, que se adecuan para la regulación de procesos apoptóticos en células tumorales a causa de su capacidad para la inhibición de interacciones entre una proteína y otra proteína, pero que no están en ninguna conexión técnica con el presente invento.

A continuación, se ilustran más detalladamente unas formas de realización específicas del invento:

35 Un objeto de este invento son unos péptidos que se componen de 5 a 25 aminoácidos, de manera preferida de 5 a 20 aminoácidos, de manera muy especialmente preferida de 10 a 15 aminoácidos, que están caracterizados porque ellos contienen la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), pero no se componen de la secuencia de aminoácidos Ser-Thr-Lys-Lys-Leu-Ser-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Ile-Gly-Asp-Glu-Leu-Asp-Ser-Asn-Met. 40 Unos péptidos preferidos conforme al invento son los que tienen la secuencia de aminoácidos Tyr-Val-Tyr-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Gln-Val-Thr-Lys-Phe (SEQ ID NO. 2) o un fragmento de la misma, que contiene por lo menos la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), en particular un péptido con la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3).

45 El concepto de “péptidos” en el sentido de este invento abarca amidas de ácidos, que se descomponen en aminoácidos al realizar una hidrólisis, a modo de ejemplo polímeros de aminoácidos tales como por ejemplo polipéptidos, oligopéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas.

50 Los péptidos conformes al invento se pueden utilizar como antígenos de inmunización para la producción de los anticuerpos conformes al invento o también para la purificación por chromatografía de afinidad de los anticuerpos conformes al invento. Además, los péptidos conformes al invento se pueden utilizar también en un procedimiento *in vitro* para la detección cuantitativa y cualitativa de un analito, de manera preferida de la variante de MR I de la FSAP. Los péptidos conformes al invento pueden estar asociados también con una fase sólida y/o con un componente de un 55 sistema que forma señales.

Un objeto adicional preferido del invento lo constituyen unos anticuerpos, que están caracterizados porque que ellos se fijan al epítopo caracterizante de la variante de MR I de la FSAP, es decir a la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3), que corresponde a los aminoácidos 528-540 60 de la variante de MR I de la FSAP.

Por el concepto de “anticuerpo” se entiende en el sentido de este invento una inmunoglobulina, por ejemplo, una inmunoglobulina de la clase o respectivamente subclase IgA, IgD, IgE, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄, IgM. Un anticuerpo tiene por lo menos un sitio de fijación (frecuentemente llamado paratopo) para un epítopo (frecuentemente llamado también determinante antigenético) en un antígeno o hapteno. Un epítopo tal está caracterizado, por ejemplo, 65 por su estructura espacial y/o por la presencia de grupos polares y/o apolares. El sitio de fijación del anticuerpo es complementario con el epítopo. La reacción entre un antígeno y un anticuerpo o respectivamente la reacción entre un hapteno y un anticuerpo funciona según el denominado “principio de llave y bocallave” y por regla general es específí-

ES 2 308 353 T3

ca en un alto grado, es decir que los anticuerpos son capaces de diferenciar entre pequeñas desviaciones en la estructura primaria, en la carga eléctrica, en la configuración espacial y en la disposición estérica del antígeno o hapteno. En particular, las denominadas “complementarity determining regions” (regiones determinantes de la complementariedad) del anticuerpo contribuyen a la fijación del anticuerpo al antígeno o al hapteno.

5 El concepto de “antígenos” abarca antígenos monovalentes y polivalentes. Un antígeno polivalente es una molécula o un complejo de moléculas, a la o al que se puede fijar simultáneamente más de una inmunoglobulina, mientras que en el caso de un antígeno monovalente, cada vez se puede fijar sólo un único anticuerpo en el mismo momento. Como hapteno se designa usualmente a una molécula, que por sí sola no es inmunógena, sino que es fijada usualmente a un
10 soporte para finalidades de inmunización.

Por el concepto de anticuerpos, en el sentido de este invento se han de entender no solamente anticuerpos completos, sino expresamente también fragmentos de anticuerpos, tales como p.ej. Fab, Fv, (F(ab')₂, Fab', así como también anticuerpos químéricos, humanizados, bi- u oligo-específicos, o anticuerpos monocatenarios (del inglés “single chain”); por lo demás también agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas y/o de sus fragmentos, siempre y cuando que se hayan conservado las propiedades de fijación al antígeno o hapteno. Se pueden producir fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, mediante una disociación enzimática de anticuerpos con enzimas, tales como pepsina o papaina. Se pueden generar agregados, polímeros y conjugados de anticuerpos por medio de numerosos y variados métodos, p.ej. por un tratamiento térmico, por una reacción con sustancias tales como aldehído glutárico, por una reacción con moléculas que se fijan a inmunoglobulinas, por una biotinilación de anticuerpos y por una subsiguiente reacción con estreptavidina o avidina, etc.

En el caso de un anticuerpo en el sentido de este invento se puede tratar también de un anticuerpo monoclonal o de un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede haber sido producido según los procedimientos usuales, p.ej. mediante 25 una inmunización de un ser humano o de un animal, tal como p.ej. un ratón, una rata, un cobaya, un conejo, un caballo, un asno, una oveja, una cabra, una gallina (véase también Messerschmid (1996) BIOforum 11: 500-502), y una subsiguiente obtención del antisuero; o mediante el establecimiento de células de hibridoma y la subsiguiente purificación del antisuero; o mediante clonación y expresión de las secuencias de nucleótidos o respectivamente de 30 versiones modificadas de éstas, que codifican las secuencias de aminoácidos, que son responsables de la fijación del anticuerpo natural al antígeno y/o hapteno.

Son anticuerpos conformes al invento, en particular, los anticuerpos, que se fijan a un péptido que se compone de 5 a 25 aminoácidos, de manera preferida de 5 a 20 aminoácidos, de manera muy especialmente preferida de 10 a 35 15 aminoácidos, el cual comprende la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), específica para la MR I de la FSAP,. Son anticuerpos muy preferidos en el sentido de este invento los anticuerpos, que se fijan específicamente al péptido con la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3) o un fragmento de este péptido, el cual abarca por lo menos la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1).

40 Son anticuerpos especialmente preferidos en el sentido de este invento también los anticuerpos que son producidos por los linajes de células de hibridoma (MAK = anticuerpo monoclonal)

- 45 a) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 9/014 (1),
- b) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 9/026 (2),
- c) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 35/05 (1),
- 50 d) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 34/08 (2) ó
- e) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 151/013 (2),

55 Los linajes de células de hibridoma a) hasta c) se depositaron el 11 de agosto de 2004 en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección alemana de Microorganismos y Cultivos celulares S.A.), Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig, Alemania, bajo los números de entrada a) DSM ACC2675, b) DSM ACC2676 y c) DSM ACC2674. Los linajes de células de hibridoma d) y e) se depositaron el 19.05.2005 en la institución de presentación antes mencionada bajo los números de entrada d) DSM ACC2725 y e) DSM ACC2726.

60 Otro objeto adicional de este invento son unos partícipes específicos en la fijación, que se fijan a un epítopo, que es reconocido por un anticuerpo conforme al invento.

Por un “partícipe específico en la fijación” se ha de entender un miembro de un par específico de fijación. En el 65 caso de los miembros de un par específico de fijación se trata de dos moléculas, que tienen en cada caso por lo menos una estructura complementaria con respecto a una estructura de la otra molécula, siendo las dos moléculas capaces de fijarse a través de una fijación de las estructuras complementarias. El concepto de molécula abarca también ciertos complejos de moléculas tales como p.ej. enzimas, que se componen de una apo- y de una coenzima, proteínas, que

ES 2 308 353 T3

se componen de varias subunidades, lipoproteínas que se componen de proteínas y lípidos, etc. Pueden ser partícipes específicos en la fijación unas sustancias que se presentan en la naturaleza pero también unas sustancias que han sido preparadas p.ej. mediante una síntesis química, por técnicas microbiológicas y/o por procedimientos de tecnología genética. Para la ilustración del concepto de partícipes específicos en la fijación, pero que no se han de entender como una limitación, se han de citar p.ej.: una globulina que fija tiroxina, proteínas que fijan esteroideos, anticuerpos, antígenos, haptenos, enzimas, lectinas, ácidos nucleicos, represores, oligo- y poli-nucleótidos, la proteína A, la proteína G, avidina, estreptavidina, biotina, el componente del complemento C1q, proteínas que fijan ácidos nucleicos, etc. Pares específicos de fijación son, por ejemplo, los de un anticuerpo y un antígeno, un anticuerpo y un hapteno, un operador y un represor, una nucleasa y un nucleótido, biotina y avidina, una lectina y un polisacárido, un esteroide y una proteína que fija al esteroide, una sustancia activa y un receptor de sustancia activa, una hormona y un receptor de hormona, una enzima y un substrato, IgG y proteína A, oligo- o poli-nucleótidos complementarios, etc.

Mediante la puesta a disposición de los anticuerpos conformes al invento, es posible por fin para un experto en la materia, p.ej. mediante experimentos de competición (véase también Peters y colaboradores (1985) Monoklonale Antikörper (Anticuerpos monoclonales), editorial Springer, capítulo 12.2 “Epitop-Analyse” (Análisis de epítopos)], identificar a otros partícipes específicos en la fijación, estando incluidos de manera expresa unos anticuerpos, que se fijan al epítopo de un anticuerpo conforme al invento. Así, entretanto se pueden seleccionar, con ayuda de bibliotecas de presentación visual de fagos (en inglés Phage Display Libraries), a través de bancos de datos de péptidos sintéticos o mediante bibliotecas de anticuerpos recombinantes (en inglés Recombinatorial Antibody Libraries) unos partícipes específicos en la fijación [Larrick & Fry (1991) Human Antibodies and Hybridomas (Anticuerpos e hibridomas humanos) 2: 172-189].

Un objeto de este invento es también un anticuerpo conforme al invento, que está asociado con una fase sólida y/o con un componente de un sistema que forma señales.

El concepto de “fase sólida” en el sentido de este invento implica a un objeto, que se compone de un material poroso y/o no poroso, por regla general insoluble en agua, y que puede presentar las formas más diversas, tales como p.ej. las de recipientes, tubitos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, bastoncillos, tiras, papel de filtro o de cromatografía, etc. Por regla general, la superficie de la fase sólida es hidrófila o puede ser hecha hidrófila. La fase sólida se puede componer de los materiales más diversos, tal como p.ej. de materiales inorgánicos y/o de materiales orgánicos, de materiales sintéticos, de materiales que se presentan en la naturaleza y/o de materiales que se presentan en la naturaleza, modificados. Ejemplos de materiales de fases sólidas son unos polímeros, tales como p.ej. los de celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, polí(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), moléculas de dextrano reticuladas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nilón; un material cerámico, vidrio, metales, en particular metales nobles tales como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de los mismos, etc.

Por el concepto de una fase sólida se abarcan conjuntamente también células, liposomas o vesículas de fosfolípidos.

La fase sólida puede tener un revestimiento a base de una o varias capas, p.ej. a base de proteínas, hidratos de carbono, sustancias lipófilas, biopolímeros, polímeros orgánicos o sus mezclas, a fin de reprimir o impedir, por ejemplo, la fijación inespecífica de componentes de muestras a la fase sólida, o a fin de conseguir por ejemplo mejoramientos en lo que respecta a la estabilidad en suspensión de fases sólidas en forma de partículas, a la estabilidad en almacenamiento, a la estabilidad de conformación o a la resistencia frente a la luz UV (ultravioleta), frente a microbios u otros agentes que actúan destrutivamente.

En el caso de un “sistema que forma señales” se puede tratar de uno o varios componentes, tratándose de una marcación detectable por lo menos en el caso de un componente. Por una marcación se ha de entender cualquier molécula, que produce por sí misma una señal o que puede inducir la producción de una señal, tal como p.ej. una sustancia fluorescente, una sustancia radiactiva, una enzima o una sustancia quimioluminiscente. La señal puede ser detectada o medida, por ejemplo, con ayuda de la actividad enzimática, de la luminiscencia, de la absorción de la luz, de la dispersión de la luz, de la radiación electromagnética o radiactiva irradiada, o de una reacción química.

Una marcación o etiqueta es capaz de producir por sí misma una señal detectable, de tal manera que no son necesarios otros componentes de ningún tipo. Muchas moléculas orgánicas absorben luz ultravioleta y luz visible, por lo que estas moléculas pueden alcanzar un estado excitado de energía y entregar la energía absorbida en forma de luz de una longitud de onda diferente de la de la luz irradiada. Otras marcaciones distintas pueden producir directamente una señal detectable, tales como p.ej. epítopos radiactivos o colorantes.

Todavía otras marcaciones o etiquetas necesitan para la generación de señales otros componentes, es decir que el sistema productor de señales incluye consigo en un caso tal todos los componentes requeridos para la formación de señales, tales como p.ej. substratos, coenzimas, extintores (en inglés quencher), aceleradores, enzimas adicionales, sustancias, que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, iones, etc.

Unas marcaciones o etiquetas adecuadas [véanse también los documentos EP 0.515.194 A2; de patentes de los EE.UU. US 5.340.716, US 5.545.834; y la cita de Bailey y colaboradores (1987) J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis 5: 649-658] son, por ejemplo, enzimas, inclusive la peroxidasa de rábano rusticano, una fosfatasa alcalina, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una alcohol deshidrogenasa, la glucosa oxidasa, la β -galactosidasa, la luciferasa, la ureasa y la acetil-colinesterasa; colorantes; sustancias fluorescentes inclusive el isotiocianato de fluoresceína,

rodamina, ficoeritrina, ficocianina, bromuro de etidio, cloruro de 5-dimetilamino-naftaleno-1-sulfonilo y quelatos fluorescentes de elementos de las tierras raras; sustancias quimioluminiscentes inclusive luminol, isoluminol, compuestos de acridinio, una olefina, un enoléter, una enamina, un aril-vinil-éter, dioxeno, un aril-imidazol, lucigenina, luciferina y aecuorina; agentes sensibilizadores inclusive eosina, 9,10-dibromo-antraceno, azul de metileno, porfirina, ftalocianina, 5 clorofila, rosa de Bengala; coenzimas; substratos enzimáticos; isótopos radiactivos inclusive ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{57}Co y ^{75}Se ; partículas, inclusive partículas magnéticas o unas partículas, de manera preferida unas partículas de látex, que por si mismas pueden estar marcadas, por ejemplo, con colorantes, agentes sensibilizadores, 10 sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, isótopos u otras marcaciones detectables; partículas de soles, inclusive soles de oro o plata; liposomas o células, que por sí mismas pueden haber sido marcadas con marcaciones detectables; etc.

Un sistema que forma señales puede abarcar también unos componentes, que en el caso de una proximidad espacial entre ellos pueden pasar a una interacción detectable entre sí, p.ej. en forma de emisores de energía y receptores de energía tales como por ejemplo agentes fotosensibilizadores y sustancias quimioluminiscentes (documento EP 15 0.515.194 A2), agentes fotosensibilizadores y un fluoróforo (documento de solicitud de patente internacional WO 95/06877), yodo 125 radiactivo y un fluoróforo (S. Udenfriend y colaboradores (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8.672-8.676), un fluoróforo y otro fluoróforo (Mathis, G. (1993) Clin. Chem. 39: 1.953-1.959) o fluoróforos y extintores de 20 fluorescencia (documento US 3.996.345). Dentro del concepto de una interacción entre los componentes se incluye la transferencia directa de energía entre los componentes, p.ej. mediante radiación de luz o de electrones así como a través de moléculas químicas reactivas de vida corta. Además, están abarcadas por este concepto también unos procesos, 25 en los cuales la actividad de un componente es inhibida o reforzada por una o varias otras, por ejemplo, la inhibición o el aumento de la actividad enzimática, o la inhibición, el aumento o la modificación (p.ej. un desplazamiento de la longitud de onda, una polarización) de la radiación electromagnética emitida por el componente sobre el que se ha influido. La interacción entre los componentes comprende también cascadas enzimáticas. En este caso, los componentes 30 son unas enzimas, de las cuales por lo menos una suministra el substrato para otra de ellas, de tal manera que resulta una velocidad de reacción máxima o mínima de la conversión acoplada del substrato. Una interacción eficaz entre los componentes tiene lugar, por regla general, cuando éstos se presentan contiguos en el espacio, por lo tanto p.ej. dentro de un intervalo de distancias de unos pocos μm (micrómetros), en particular dentro de un intervalo de distancias situado por debajo de 600 nm, de manera preferida por debajo de 400 nm, y de manera muy especialmente preferida por debajo de 200 nm.

Las micropartículas se usan frecuentemente como una fase sólida y/o como una marcación. Por el concepto de "micropartículas" se han de entender en el sentido de este invento unas partículas, que tienen un diámetro aproximado de por lo menos 20 nm y de no más que 20 μm , usualmente entre 40 nm y 10 μm , de manera preferida entre 0,1 y 10 μm , de manera especialmente preferida entre 0,1 y 5 μm , de manera muy especialmente preferida entre 0,15 y 2 μm . Las micropartículas 35 pueden estar conformadas regular o irregularmente. Ellas pueden constituir esferas, esferoides, o esferas con unas cavidades o unos poros más o menos grandes. Las micropartículas se pueden componer de un material orgánico, de un material inorgánico o de una mezcla o una combinación de ambos. Ellas se pueden componer de un material poroso o no poroso, de un material hinchable o de un material no hinchable. En principio, las micropartículas 40 pueden tener una densidad arbitraria, se prefieren, sin embargo, unas partículas que tienen una densidad, que está cercana a la densidad del agua, tal como de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,5 g/ml. Las micropartículas preferidas son suspendibles en soluciones acuosas y son estables en suspensión durante un período de tiempo lo más largo que sea posible. Ellas pueden ser transparentes, parcialmente transparentes o no transparentes (opacas). Las micropartículas 45 se pueden componer de varias capas, tales como, por ejemplo, las denominadas partículas de núcleo y envoltura (en inglés "core and shell") con un núcleo y una o varias capas envolventes.

El concepto de micropartículas abarca, por ejemplo, cristales de colorantes, soles de metales, partículas de sílice, 50 partículas de vidrio, partículas magnéticas, partículas poliméricas, gotas de aceite, partículas de lípidos, un dextrano y agregados de proteínas. Las micropartículas preferidas son unas partículas suspendibles en soluciones acuosas, y que se componen de un material polimérico insoluble en agua, en particular a base de polietilenos sustituidos. Se prefieren 55 muy especialmente unas partículas de látex, p.ej. a base de un poliestireno, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ácido metacrílico, polímeros de acrilonitrilo, polímeros de acrilonitrilo, butadieno y estireno, un polí(acetato de vinilo y acrilato), una poli(vinil-piridina), y polímeros de cloruro de vinilo y acrilato. Presentan un interés especial las partículas de látex que tienen grupos reactivos junto a su superficie, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo, 60 amino o aldehído, que permiten establecer una fijación por enlaces covalentes, p.ej. de partícipes específicos en la fijación a las partículas de látex. La producción de partículas de látex se ha descrito por ejemplo en los documentos EP 0.080.614, EP 0.227.054 y EP 0.246.446.

El concepto de "asociado" se ha de entender en un sentido amplio y comprende, por ejemplo, una fijación por 65 enlaces covalentes y una fijación por enlaces no covalentes, una fijación directa y una indirecta, la adsorción a una superficie y el encerramiento en una cavidad o en un espacio hueco, etc. En el caso de una fijación por enlaces covalentes, los anticuerpos o los partícipes en la fijación están unidos a través de un enlace químico a la fase sólida o a la marcación. Ejemplos de una fijación por enlaces no covalentes son la adsorción a superficies, el encerramiento en espacios huecos o la fijación de dos partícipes específicos en la fijación. Junto a una fijación directa a la fase sólida o a la marcación, los anticuerpos o los partícipes en la fijación pueden estar fijados a la fase sólida o a la marcación también indirectamente a través de una interacción específica con otros partícipes específicos en la fijación (véase el documento EP 0.411.945 A2). Esto se ha de explicar más detalladamente con ayuda de ejemplos: El anticuerpo biotinilado puede ser fijado a la marcación a través de una avidina fijada a la marcación, o un conjugado entre fluoresceína y un anticuerpo

ES 2 308 353 T3

se puede fijar a la fase sólida a través de anticuerpos anti-fluoresceína fijados a la fase sólida, o el anticuerpo se puede fijar a la fase sólida o a la marcación a través de proteínas que fijan a inmunoglobulinas.

- Un objeto adicional de este invento son anticuerpos conformes al invento o partícipes específicos en la fijación, que
- 5 se pueden utilizar como un agente de diagnóstico *in vitro* o como un componente de un agente de diagnóstico *in vitro*. En el caso de un agente de diagnóstico *in vitro*, el analito que se ha detectar, p.ej. la variante de Marburg I de FASP, se determina en una muestra fuera de un cuerpo humano o de un animal viviente, o se determina su concentración o su cantidad.
- 10 Por una “muestra” se entiende en el sentido del invento el material que contiene presuntamente la sustancia que se ha de detectar (acerca de ejemplos del concepto de “analito” véase el documento EP 0.515.194 A2, páginas 8-15). El concepto de una muestra abarca por ejemplo líquidos o tejidos biológicos, en particular de seres humanos y animales, tales como una sangre, un plasma, un suero, un esputo, un material exudado, un líquido de lavado bronquioalveolar, un líquido linfático, un líquido sinovial, un líquido seminal, una mucosa vaginal, heces, una orina, un líquido cefalorraquídeo, pelos, piel, muestras o secciones de tejidos. Además, se abarcan muestras de cultivos de células, líquidos o tejidos vegetales, muestras forenses, muestras de aguas y de aguas residuales, alimentos, medicamentos. Eventualmente las muestras tienen que ser tratadas previamente, a fin de hacer a los analitos accesibles para el procedimiento de detección o a fin de eliminar componentes perturbadores de las muestras. Un tal tratamiento previo de las muestras puede incluir la separación y/o la lisis de células, la precipitación, la hidrólisis o la desnaturización de componentes
- 15 de las muestras, tales como p.ej. proteínas, la centrifugación de muestras, el tratamiento de una muestra con disolventes orgánicos tales como p.ej. alcoholes, en particular metanol; y el tratamiento de una muestra con detergentes. Frecuentemente, la muestra es transferida a otro medio, que en la mayoría de los casos es acuoso, el cual a ser posible no deberá de interferir con el procedimiento de detección.
- 20 Los anticuerpos conformes al invento se pueden utilizar en un procedimiento para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito, de manera preferida de la variante de Marburg I de la FSAP, en una muestra.
- 25 En el caso de una detección cuantitativa, se mide la cantidad, la concentración o la actividad (p.ej. la actividad enzimática) del analito en la muestra. Por el concepto de la “detección cuantitativa” son abarcados también unos métodos semicuantitativos, que sólo detectan la cantidad, concentración o actividad aproximada del analito en la muestra, o que sólo pueden servir para una indicación relativa de cantidades, concentraciones o actividades. Por una detección cualitativa se ha de entender la detección de la presencia del analito en la muestra en general, o la indicación, de que la concentración o la actividad del analito en la muestra está situada por debajo o por encima de un determinado valor de umbral o de varios determinados valores de umbral.
- 30 El invento se refiere, por consiguiente, también a procedimientos para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito, de manera preferida de la variante de Marburg I de la FSAP, en una muestra, y a reactivos apropiados para esto.
- 35 Para la detección de analitos se emplean frecuentemente ensayos de fijación, en los cuales por medio de una fijación específica de un analito que se ha de detectar, a partícipes en la fijación que son específicos para el analito, se pueden sacar conclusiones en cuanto a la presencia, ausencia o cantidad del analito en una muestra. Unos inmunoensayos o también unos procedimientos, en los que se hibridan oligo- o polinucleótidos, son ejemplos de ensayos de fijación.
- 40 Los denominados “ensayos de fijación heterogéneos” están caracterizados por una o varias etapas de separación y/o etapas de lavado. La separación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación, precipitación con sustancias tales como un poli(etilenglicol) o sulfato de amonio, filtración, separación magnética, y fijación a una fase sólida. Una tal “fase sólida” se compone de un material poroso y/o no poroso, que por regla general es insoluble en agua. Ella puede tener las formas más diversas, tales como p.ej. las de recipientes, tubitos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, bastoncillos, tiras, papeles de filtro o de cromatografía, etc. En el caso de ensayos de fijación heterogéneos en el formato de emparedado, por regla general, uno de los partícipes en la fijación, que es específico para el analito, es fijado a una fase sólida, y sirve para la separación del complejo de fijación “entre un analito y un partícipe en la fijación, que es específico para el analito” desde la fase líquida, mientras que el otro partícipe en la fijación, que es específico para el analito, lleva una marcación detectable, p.ej. una enzima, una marcación fluorescente o quimioluminiscente, para la detección del complejo de fijación. Estos procedimientos de ensayo se subdividen adicionalmente en los denominados ensayos de emparedado de una etapa, en los que los dos partícipes específicos en la fijación son incubados simultáneamente con la muestra, y en los ensayos de emparedado de dos etapas, en los que la muestra es incubada primeramente con el reactivo en fase sólida y, después de una etapa de separación y lavado, el complejo de fijación, que está fijado a la fase sólida, a base de un analito y de un partícipe en la fijación, que es específico para el analito, se incuba con el reactivo de detección.
- 45 En los caso de “ensayos de fijación homogéneos” no se efectúa ninguna separación entre componentes libres y componentes del sistema que forma señales, que están fijados al “complejo de analito y partícipe en la fijación, que es específico para el analito”. La tanda de ensayo, que contiene los partícipes en la fijación, que son específicos para el analito, los componentes formadores de señales y la muestra, se mide después de, o incluso durante, la reacción de fijación sin ninguna etapa de separación y/o lavado adicional, y se determina la correspondiente señal de medición. Ejemplos de inmunoensayos homogéneos [véase también Boguslaski & Li (1982) Applied Biochemistry and Biotechnology 7, 401-414] son muchos métodos turbidimétricos o nefelométricos, pudiendo los partícipes en la fijación, que

ES 2 308 353 T3

son específicos para el analito, utilizados para la detección, estar asociados con partículas de látex, tales como p.ej. ensayos EMIT®; ensayos CEDIA®; inmunoensayos de fluorescencia y polarización; inmunoensayos por canalización de oxígeno luminescente (en inglés “Luminiscent Oxygen Channelling Immunoassays”) [LOCI®, véase el documento EP 0.515.194 A2; Ullman y colaboradores (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 5.426-5.430; Ullman y colaboradores

5 (1996) Clinical Chemistry 42: 1.518-1.526] etc. En el caso de un ensayo homogéneo de emparedado, tal como p.ej. un ensayo de látex nefelométrico, los reactivos que contienen anticuerpos se incuban en común con la muestra y se lleva a cabo la medición de la señal durante y/o después de la incubación, sin que se lleve a cabo ninguna etapa de separación o lavado antes de la medición. Dicho de otra manera: No sigue ninguna separación del analito fijado a anticuerpos desde el analito libre o desde anticuerpos, que no tienen fijado ningún analito.

10 Los anticuerpos conformes al invento se adecuan en particular para la utilización en ensayos de fijación homogéneos.

15 Los ensayos de fijación homogéneos y heterogéneos se pueden llevar a cabo también en forma de un denominado “ensayo de emparedado”. En este caso, el analito, p.ej. en el caso de un ensayo de fijación heterogéneo, es fijado por un partícipe en la fijación, que es específico para el analito y que está asociado a una fase sólida, y por un partícipe en la fijación, que es específico para el analito y que está asociado con un componente de un sistema que forma señales. En el caso de inmunoensayos de emparedado, unos anticuerpos o antígenos o haptones pueden constituir los partícipes en la fijación, que son específicos para el analito.

20 Otra forma de realización especial de un ensayo de fijación heterogéneo u homogéneo es el “inmunoensayo indirecto”. El analito es en este caso un anticuerpo. Uno de los partícipes en la fijación, que es específico para el analito, es el antígeno o p.ej. los péptidos conformes al invento o un antígeno modificado del anticuerpo que se ha de detectar (= analito), y el otro partícipe en la fijación, que es específico para el analito es, por regla general, una proteína que fija a inmunoglobulinas, tal como p.ej. un anticuerpo, que es capaz de fijar específicamente al anticuerpo que se ha de detectar (= analito).

25 En el caso de un “ensayo de fijación competitivo”, homogéneo o heterogéneo, el analito de la muestra y el analito del reactivo compiten por la fijación a un número limitado de partícipes en la fijación, que son específicos para el analito. El analito del reactivo es por ejemplo un “analito modificado”, tal como p.ej. un analito etiquetado o marcado, un fragmento de analito tal como p.ej. los péptidos conformes al invento, o un análogo al analito. Ejemplos para ilustrar este principio: (i) Un analito de una muestra compite con un analito de un reactivo, que está asociado con un componente de un sistema que forma señales, por la fijación a partícipes en la fijación, que son específicos para el analito, y que están asociados a una fase sólida, o (ii) un analito de una muestra compite con un analito asociado a una fase sólida (= analito del reactivo) por la fijación a partícipes en la fijación, que son específicos para el analito, los cuales están asociados a un componente de un sistema que forma señales.

30 La detección de la variante de Marburg I de la FSAP con los anticuerpos conformes al invento se puede realizar también con unos procedimientos, tales como, por ejemplo, un borrón de transferencia Western (Western blot), un borrón-punto de transferencia (dot-blot), una inmunolectroforesis, una electroforesis por immunofijación, una electroinmunodifusión, una inmunoprecipitación, un inmunodifusión radial, una inmunofijación, una cromatografía inmunitaria, una aglutinación de látex, un ensayo turbidimétrico o nefelométrico, un ensayo de fijación homogéneo o heterogéneo, un ensayo de una o dos etapas, un ensayo de emparedado, un ensayo indirecto, un ensayo competitivo, ensayos “point-of-care”, etc. Estos y otros procedimientos de detección se han descrito por ejemplo en “Labor und Diagnose” (Laboratorio y diagnóstico), coordinador de edición L. Thomas, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1998, capítulo 60, o en “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques” (Técnicas de laboratorio en la bioquímica y la biología molecular - Una introducción al inmunoensayo radiológico y a técnicas relacionadas con él), coordinador de edición T. Chard, Elsevier, Amsterdam, 1987.

35 50 55 60 65 El concepto de “ensayos point of care” o “ensayos POC” incluye los ensayos, en los que no se requiere ningún aparato separado de análisis o medición para la realización de los ensayos o para la evaluación de los ensayos. Los ensayos POC están basados en muchos casos en procedimientos cromatográficos inmunitarios, en separaciones de complejos inmunitarios por filtración y/o técnicas de fijación inmunitaria. Los ensayos POC están concebidos en particular para mediciones directas *in situ*, p.ej. junto al lecho del enfermo o en su domicilio, para el médico de urgencias y/o en la consulta de un médico que trabaja en ella, y en menor grado para el laboratorio a gran escala. Los ensayos POC pueden ser realizados en particular también por unas personas, que no tengan ninguna formación ni ninguna experiencia detalladas de técnica de medicina en el sector de la medicina de laboratorios. Por el concepto de “ensayos POC” se han de entender en el sentido de este invento también los denominados ensayos caseros o unos ensayos OTC, que pueden ser llevados a cabo por personas inexpertas en medicina, así como, por ejemplo, los diversos ensayos del embarazo, que se pueden realizar para el uso casero. Otros ensayos POC conciernen, por ejemplo, a la detección de marcadores de infartos cardíacos, drogas, medicamentos, marcadores de infecciones e inflamaciones. En los casos de muchos ensayos POC, unos partícipes específicos en la fijación, en el transcurso de la realización del ensayo, están asociados o se asocian a o sobre tiras o discos de filtración o cromatografía. Una reacción de detección positiva o negativa puede estar vinculada, por ejemplo con la aparición o no aparición de una banda coloreada en un determinado compartimiento de ensayo, y/o con la aparición o no aparición de un determinado símbolo, p.ej. un “+”, un “-” y/o con la intensidad de la respectiva señal de medición.

ES 2 308 353 T3

Un ensayo POC para la variante de Marburg I de la FSAP puede estar estructurado de la siguiente manera: Una muestra y anticuerpos marcados, que son capaces de fijar a la variante de Marburg I de la FSAP, pero no a una FSAP de tipo salvaje ni a otras variantes de la FSAP, se aplican sobre una tira de ensayo. Unas marcas adecuadas son, p.ej., partículas de látex coloreadas, oro coloidal, enzimas, etc. Siempre y cuando que la variante de Marburg I de la FSAP esté contenida en la muestra, se formarán complejos entre el anticuerpo y la MR I de la FSAP. Estos complejos se mueven p.ej. mediante una fuerza capilar en dirección a una región, en la que se encuentran unos anticuerpos, que son capaces de fijarse a otros epítopos de MR I de la FSAP, y que están fijados p.ej. en forma de una banda, o que son fijados en el transcurso del procedimiento de ensayo (p.ej. a través de un puente de biotina y avidina). Los complejos marcados entre un anticuerpo y la MR I de la FSAP son fijados en esta zona y forman con los anticuerpos fijados un complejo de emparedado. La intensidad de la señal de marcación es aquí proporcional a la concentración de MR I de la FSAP en la muestra. En el caso de un procedimiento de ensayo POC competitivo, por ejemplo unos fragmentos de anticuerpos pueden estar fijados en una zona de la tira de ensayo o pueden ser fijados en el transcurso del procedimiento de ensayo. Este anticuerpo fijado competiría con la variante de Marburg I de la FSAP procedente de la muestra, por la fijación a anticuerpos anti-MR I de la FSAP que están marcados. Alternativamente, también unos anticuerpos anti-variante de Marburg I de la FSAP que están fijados y una proteína MR I de la FSAP marcada, o respectivamente los péptidos conformes al invento, se pueden emplear para la constitución de un ensayo competitivo de la variante de Marburg I de la FSAP.

Una forma de realización especialmente preferida del procedimiento conforme al invento es un ensayo nefelométrico o turbidimétrico, en particular, un ensayo del tipo en el que se emplean anticuerpos conformes al invento - de manera preferida asociados con micropartículas (en particular con micropartículas de látex) -.

Otro objeto conforme al invento es un estuche de ensayo, que contiene uno o varios de los anticuerpos y/o de los péptidos conformes al invento. En un estuche de este tipo están contenidos usualmente todos, o sólo algunos de, los componentes de un ensayo, en una forma envasada. Los anticuerpos y/o los péptidos conformes al invento pueden ser asociados, por ejemplo, con una o varias fases sólidas y/o con uno o varios componentes de un sistema que forma señales. El estuche de ensayo puede contener, por ejemplo, patrones, testigos, calibradores, así como otros reactivos, tales como p.ej. tampones, soluciones de lavado, soluciones que provocan una señal de medición y/o un substrato enzimático, cubetas, pipetas y/o instrucciones de ensayo.

Como patrones, testigos o calibradores en procedimientos para la detección cuantitativa o cualitativa de la variante de Marburg I de la FSAP con ayuda de partícipes específicos en la fijación, se adecuan unas formulaciones liofilizadas reconstituibles y en particular unas formulaciones líquidas, que tienen o bien una cantidad definida de la proteína de Marburg I de la FSAP, natural o recombinante, o una cantidad definida de un péptido conforme al invento, que tiene la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), pero que no se compone de la secuencia de aminoácidos Ser-Thr-Lys-Lys-Leu-Ser-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Ile-Gly-Asp-Glu-Leu-Asp-Ser-Asn-Met. Asimismo, son adecuados unos péptidos que están compuestos de una parte, que se compone de 5 a 25 aminoácidos, que contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), y de otra parte adicional que se compone de 5 a 15 aminoácidos, que contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Glu-Phe-His-Glu (SEQ ID NO. 4). La parte citada en último lugar de tales péptidos de fusión se compone de manera preferida de un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Leu-Lys-Glu-Glu-Phe-His-Glu-Gln-Ser-Phe-Arg-Val (SEQ ID NO. 5) o de un fragmento del mismo, que contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Glu-Phe-His-Glu (SEQ ID No. 4). La secuencia de aminoácidos Glu-Glu-Phe-His-Glu (SEQ ID No. 4) corresponde a las posiciones de los aminoácidos 383 hasta 387 de la proenzima de la FSAP y representa un epítopo, que está presente tanto en la proteína FSAP de tipo salvaje como también en la variante de Marburg I de la FSAP. Dado que los péptidos de fusión conformes al invento son fijados tanto por partícipes en la fijación que tienen una especificidad para el polimorfismo de Marburg I de la FSAP, tales como p.ej. por los anticuerpos conformes al invento, así como también por partícipes en la fijación que tienen una especificidad para el epítopo, que contiene la secuencia Glu-Glu-Phe-His-Glu, de la proenzima de la FSAP, tales como p.ej. anticuerpos monoclonales, que son formados por el linaje de células de hibridoma, que se ha depositado bajo el número de entrada DSM ACC2453 en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH en Braunschweig, Alemania (véase el documento EP 1.182.258 A1), ellos se adecuan en particular para la normalización, la calibración o el control de procedimientos de ensayo de emparedado cualitativos y cuantitativos. Los péptidos de fusión se pueden preparar mediante una correspondiente síntesis peptídica. Asimismo, es posible unir el epítopo de Marburg I de la FSAP y el epítopo de tipo salvaje con ayuda de agentes reticulantes (cross-linker) homobifuncionales, tales como p.ej. el dialdehído glutárico o ésteres de bi-NHS, o con ayuda de agentes reticulantes heterobifuncionales, tales como p.ej. N-hidroxí-succinimida (NHS)-X-maleimida o respectivamente NHS-X-haloacetilo, ésteres de N-γ-maleimido-butiriloxi-succinimida (GMBS), N-succinimidil-aminobenzoato de 4-yodoacetilo (SIAB) y reactivos heterobifuncionales, que generan un grupo SH libre, tales como p.ej. iminotiolanos, S-acetil-tioacetato de N-succinimidilo (SATA), 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-succinimidiloxicarbonil-metil-α-(2-piridiltio)-tolueno (SMPT), o conjugar los dos epítopos con un soporte común, tal como p.ej. ovalbúmina, albúmina, hemocianina de lapa de bocalave (Keyhole Limpet Hämocyanin = KLH), alfa-lactoalbumina bovina, así como con polímeros, tales como p.ej. un dextrano, un polí(etylenglicol), una polí(acrilamida) o una polí-(d-glutamina-d-lisina), etc. Los péptidos se pueden fijar a estos soportes por ejemplo con ayuda de carbodiimida o de aldehído glutárico o también mediante un reactivo heterobifuncional, que también puede actuar como un elemento espaciador (en inglés "spacer"), tal como p.ej. un éster de N-maleimido-butiriloxi-succinimida (GBMS). Acerca de otros ejemplos y métodos de acoplamiento véase también Wong, S. (1993) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking (Química de la conjugación y reticulación de proteínas), CRC Press Inc., Boca Ratón.

ES 2 308 353 T3

Un estuche de ensayo preferido conforme al invento contiene anticuerpos conformes al invento y/o péptidos conformes al invento asociados con partículas de látex.

Otro estuche de ensayo conforme al invento contiene un producto plasmático a base de una agrupación (pool) de 5 por lo menos cinco, de manera preferida de más que 20 plasmas humanos de donantes heterocigóticos de Marburg I de la FSAP. Los donantes heterocigóticos pueden ser identificados mediante procedimientos de escrutinio (screening) conocidos (véase el documento EP 1.182.258 A1) y, por supuesto, también con ayuda de los anticuerpos conformes al invento. Una tal agrupación de plasmas de Marburg I de la FSAP se puede utilizar p.ej. como patrón, definiéndose para la agrupación un valor de referencia, tal como p.ej. 100% o 1 UEP/ml (unidades equivalentes de plasma por mililitro). 10 Una tal agrupación o respectivamente diferentes diluciones de la agrupación de plasmas se pueden utilizar para el ajuste de subpatrones (p.ej. patrones de péptidos) o también para el establecimiento de un valor de corte (cut-off) y de un intervalo intermedio (zona gris) que eventualmente se requiere para una detección del antígeno de la variante de Marburg I de la FSAP.

15 Los anticuerpos y péptidos conformes al invento se pueden utilizar también para la cromatografía de afinidad. Por el concepto de "cromatografía de afinidad" se ha de entender un método para la purificación y el aislamiento de sustancias, en particular de biopolímeros, que está basado en el hecho de que muchas sustancias pueden pasar a formar una fijación reversible, por enlaces no covalentes y selectiva, con unos partícipes en la fijación, que son específicos para ellas. El principio del procedimiento consiste en que el partícipe específico en la fijación es fijado 20 por regla general por enlaces covalentes a una matriz insoluble (p.ej. vidrios porosos, geles sobre la base de agarosa, celulosa, dextrano, polímeros y gel de sílice), y es puesto en contacto con una muestra que contiene la sustancia. La sustancia buscada es inmovilizada y retenida debido a su interacción específica con el partícipe específico en la fijación que está fijado a la matriz, mientras que todas las otras sustancias, que están contenidas en la muestra, son separadas mediante elución. A continuación, la sustancia buscada se desprende desde la matriz con ayuda de un agente 25 de elución adecuado, que suprime la fijación por enlaces no covalentes entre la sustancia y el partícipe específico en la fijación (véase también E. Buddecke, 1989, Grundrisse der Biochemie (Fundamentos de la bioquímica), Walter de Gruyter, capítulo 7 "Proteínas").

Otro objeto de este invento abarca anticuerpos conformes al invento o péptidos conformes al invento en un medio 30 de inyección estéril, farmacéuticamente compatible. Por un medio de inyección estéril, farmacéuticamente compatible, se ha de entender por ejemplo una solución exenta de pirógenos y exenta de gérmenes, p.ej. una solución salina u otra solución electrolítica, tal como se utiliza de manera usual para la administración por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea de medicamentos, vacunas o agentes de contraste.

35 Todavía otro objeto de este invento es la utilización de los anticuerpos conformes al invento como un agente de diagnóstico o como componente de un agente de diagnóstico.

Otro objeto del invento de este invento es un procedimiento para la producción de un anticuerpo conforme al invento, que está caracterizado porque para la inmunización se emplean uno o varios péptidos que se componen de 40 5 a 25 aminoácidos, de manera preferida de 5 a 20 aminoácidos, de manera muy especialmente preferida de 10 a 15 aminoácidos, los cuales contienen la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), pero no se componen de la secuencia de aminoácidos Ser-Thr-Lys-Lys-Leu-Ser-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Ile-Gly-Asp-Glu-Leu-Asp-Ser-Asn-Met. Se prefieren de manera especial en este procedimiento conforme al invento como antígenos de inmunización los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-45 Val-Tyr (SEQ ID NO. 3) o fragmentos que abarcan por lo menos la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1).

Los anticuerpos conformes al invento se pueden producir también mediante la utilización de la proteína MR I de la FSAP que se presenta en la naturaleza y/o recombinante, o respectivamente de fragmentos de éstas, que contienen 50 el polimorfismo específico para la MR I de la FSAP.

Los péptidos utilizados como antígenos de inmunización se pueden utilizar para la inmunización en un estado no fijado y/o fijado a un soporte.

55 Unos soportes típicos son, por ejemplo, proteínas, tales como p.ej. ovalbúmina, albúmina o hemocianina de lapa de bocallave (KLH), polímeros, tales como un dextrano, un poli(etilenglicol), una poli(acrilamida) o una poli-(d-glutamina-d-lisina), etc. Los péptidos se pueden fijar a estos soportes por ejemplo con ayuda de carbodiimida o de aldehído glutárico o también mediante un reactivo heterobifuncional, que también puede actuar como un elemento espaciador (en inglés "spacer"), tal como p.ej. un éster de N-maleimido-butiriloxi-succinimida (GBMS). Para otros ejemplos y métodos de acoplamiento, véase también Wong, S. (1993) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking (Química de la conjugación y reticulación de proteínas), CRC Press Inc., Boca Ratón.

65 Un procedimiento preferido para la preparación de los péptidos conformes al invento, que se utilizan, entre otras cosas, como antígenos de inmunización, es la síntesis en fase sólida, sintetizándose un número múltiple de copias de un péptido junto a un núcleo de lisina [véase también Tam J. P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5.409-5.413]. La síntesis de péptidos se lleva a cabo preferiblemente con ayuda de aparatos automáticos, tal como los que son ofrecidos p.ej. por Applied Biosystems (EE.UU), de acuerdo con un protocolo clásico. Tales péptidos multímeros pueden ser fijados adicionalmente a una proteína de soporte.

ES 2 308 353 T3

El antígeno de inmunización se puede recoger por ejemplo en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se puede mezclar con el denominado “adyuvante inmunitario fácil de ratón” Immun Easy Mouse Adjuvans. Esta emulsión se puede aplicar luego p.ej. por vía intradérmica, intraperitoneal y/o subcutánea a un animal, por ejemplo a un conejo, un ratón, una rata, un cobaya, un caballo, un asno, una oveja, una cabra, una gallina, etc. Las inyecciones reforzadoras (booster) pueden ayudar a aumentar la respuesta inmunológica, pudiendo el antígeno de inmunización 5 también estar emulsionado con un adyuvante de Freund incompleto.

Los anticuerpos policlonales conformes al invento se pueden obtener a partir del antisuero de los animales inmunizados y se pueden purificar ulteriormente mediante una cromatografía de afinidad a través de una matriz, a la 10 que se habían fijado, por ejemplo, la variante de Marburg I de la FSAP o los péptidos empleados como antígeno de inmunización.

A fin de producir anticuerpos monoclonales conformes al invento, según los procedimientos generalmente conocidos [véase Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Anticuerpos: un manual de laboratorio), Cold 15 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Peters y colaboradores (1985) Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung (Anticuerpos monoclonales, producción y caracterización), editorial Springer] las células inmunitarias de animales inmunizados, tales como p.ej. las de un ratón o de un conejo, se fusionan con células de mieloma para la producción de células de hibridoma que producen anticuerpos, y a continuación se aíslan y se individualizan 20 los clones adecuados. La elección de los clones que producen los anticuerpos monoclonales deseados, se realiza con ayuda de procedimientos de escrutinio (screening) específicos. En este caso, se comprueba la especificidad para la fijación de los anticuerpos entregados al material sobrenadante de cultivo de células, p.ej. al antígeno de inmunización o a un eventual soporte del antígeno de inmunización mediante un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo radiológico y/o un borrón de transferencia Western. Los hibridomas, que producen anticuerpos conformes al invento, 25 son multiplicados por clonación. Las células de hibridoma, obtenidas de esta manera, están entonces a disposición para una producción duradera de anticuerpos monoclonales. Unas cantidades más grandes de anticuerpos se pueden obtener, por ejemplo, a partir de un material sobrenadante de cultivo de células, en particular desde fermentadores o cultivos rodantes, así como de una ascitis.

Según sea la finalidad de utilización deseada, es ventajoso emplear solamente ciertas partes de los anticuerpos, 30 tales como por ejemplo los fragmentos Fab, F(ab')₂ o Fab'. Éstas/os se pueden producir, por ejemplo, con los procedimientos de disociación enzimática que son conocidos para un experto en la especialidad [véase Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Anticuerpos, Un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor].

35 Los sitios de fijación a antígenos de un anticuerpo se encuentran en los denominados dominios variables, que son codificados por los genes V. Con los conocidos métodos de tecnología genética [p.ej. Sambrook y colaboradores (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: Un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2^a edición; McCafferty y colaboradores (1990) Nature 348: 552-554] se puede determinar también la correspondiente secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo conforme al invento, así 40 como de esta manera también la correspondiente secuencia de aminoácidos, siempre y cuando que ésta todavía no hubiera sido ya conocida por secuenciación de aminoácidos. Como material de partida para tales análisis se pueden emplear las células de hibridoma o respectivamente las células inmunitarias, que producen los anticuerpos, de animales inmunizados.

45 Con el conocimiento de la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos, con ayuda de los métodos usuales de tecnología genética y de biología molecular [véase también Johnson & Chiswell (1993) Current Opinion in Structural Biology [Opinión actual en biología estructural] 3: 584-571] se pueden producir entonces unos anticuerpos bifu oligoespecíficos, químéricos, humanizados, así como unos péptidos derivados de la región determinante de complementariedad (en inglés “complementarity determining region”) (unidades de reconocimiento mínimo) (en inglés “minimal recognition units”), unos fragmentos monocatenarios y/o unos productos de fusión funcionales, p.ej. construcciones artificiales de un anticuerpo y una enzima, producidas por vía recombinante [véase Larrick & Fry (1991) Human Antibodies and Hybridomas [Anticuerpos e hibridomas humanos] 2: 172-189; Kitano y colaboradores (1986) Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 282-286; Thompson y colaboradores (1986) J. Immunol. Methods 94: 7-12], que se 50 fijan al epítopo específico para la MR I de la FSAP, en particular a un péptido conforme al invento. Con tales péptidos incluidos dentro del concepto de “anticuerpos” se puede conseguir por ejemplo una disminución de la inmunogenicidad y/o una eficacia reforzada en el caso de su administración como medicamentos o en el diagnóstico *in vivo*, y/o resultan ventajas para el empleo como agente de diagnóstico *in vitro* o en un tal agente de diagnóstico. Los anticuerpos se 55 pueden producir también, eventualmente con ayuda de métodos de tecnología genética, en hongos tales como p.ej. células de levaduras [Fischer y colaboradores (1999) Biol. Chem. 380: 825-839; Hiatt y colaboradores (1992) Genetic Engineering [Ingeniería genética] 14: 49-64), en células vegetales, animales y procarióticas (véase el documento. WO 95/25172), así como en células humanas aisladas.

60 Un objeto adicional de este invento son también hongos, células animales, vegetales o procarióticas, así como células humanas aisladas, que producen un anticuerpo conforme al invento. Una forma de realización preferida de este invento comprende linajes de células de hibridoma, que producen los anticuerpos conformes al invento, por ejemplo los linajes de células de hibridoma a) ECE-KLH 2004-9/014, b) ECE-KLH 2004-9/026, c) ECE-KLH 2004-35/05, d) ECE-KLH 2004-34/08 y e) ECE-KLH 2004-151/013, que se habían depositado en la DSMZ - Deutsche Sammlung von 65

ES 2 308 353 T3

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, con los números de entrada a) DSM ACC2675, b) DSM ACC2676, c) DSM ACC2674, d) DSM ACC2725 y e) DSM ACC2726.

Los Ejemplos descritos a continuación sirven para la ilustración ejemplificadora de algunos aspectos individuales 5 de este invento y no se han de entender como una restricción.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos monoclonales específicos para la Marburg I de la FSAP

1a) Inmunización de ratones

15 Unos ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intraperitoneal en cada caso con 20 µg de un antígeno de inmunización [un péptido fijado a KLH, que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3)] en el Immun Easy Mouse Adjuvans (de Qiagen GmbH, Alemania). Después de 4 y 8 semanas, se efectuó una inyección de refuerzo en cada caso con 20 µg de un antígeno de inmunización sin ningún adyuvante. En los últimos 3 días antes de la fusión se reforzaron los ratones por vía intravenosa en cada caso con 10 20 µg de un antígeno de inmunización.

1b) Fusión

25 Después de haber sacrificado a los ratones mediante una inhalación de CO₂, se les extrajeron los bazo y se produjeron suspensiones de células individuales en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; de PAN Biotech GmbH, Alemania) exento de suero. Las células se centrifugaron (652 x g) y se lavaron 2 x (veces) en el DMEM. A continuación, se determinó el número de células mediante una coloración con azul de Trypan. A aproximadamente 30 10⁸ células de bazo se les añadieron 2 x 10⁷ células de mieloma (Sp2/0). Después de haber centrifugado (360 x g), se desecharó el material sobrenadante, se añadió al sedimento de células 1 ml de una solución de un poli(etilenglicol) (PEG 4000, de Merck Eurolab GmbH, Alemania; aproximadamente al 50% en DMEM) y, después de una resuspensión, se incubó durante 1 minuto a 37°C. A continuación se añadieron aproximadamente 10 ml del DMEM y se incubó durante 2 hasta 4 minutos a la temperatura ambiente. Las células fusionadas se separaron por centrifugación (326 x g) y el sedimento se volvió a suspender en el DMEM + 10% de un suero de ternera fetal (de Bio Whittaker Europe, Bélgica) + 35 un medio HAT (de CC Pro GmbH, Alemania) y se cargaron en placas de cultivo de células de 24 pocillos (de Corning Costar GmbH, Alemania). La concentración aproximada de células fue de desde 5 x 10⁴ hasta 5 x 10⁶ células por pocillo.

40 Después de 2 a 3 semanas se sacaron las resultantes colonias de células (híbridos) y se transfirieron a nuevas placas de cultivo.

1c) Escrutinio

45 La especificidad de los anticuerpos entregados al cultivo de células se ensayó en una primera etapa de ensayo con ayuda de placas de microtitulación (de Nunc GmbH & Co. KG, Alemania), que se habían revestido con la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3).

50 En cada pocillo de la placa de microtitulación se introdujeron con pipeta 100 µl del material sobrenadante del cultivo de células (dilución a 1:2) y se incubaron durante 1 hora a +15°C hasta +25°C. Después de haber lavado dos veces la placa con una solución de lavado y POD (OSEW; de Dade Behring Marburg GmbH, Alemania), en cada pocillo se cargaron 100 µl de un conjugado de IgG/F(ab')₂ anti-ratón y de POD (de Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incubaron durante 1 hora a +15°C hasta +25°C. Después de haber lavado adicionalmente dos veces la placa, se cargaron en cada pocillo 100 µl de una solución del cromógeno TMB (de Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se incubaron durante otros 30 minutos a +15°C hasta +25°C. Después de la incubación, se cargaron en cada pocillo 100 µl de una solución de interrupción de POD (de Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) y se evaluó la placa de microtitulación en el aparato BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II, de Dade Behring Marburg GmbH, Alemania) a 450 nm.

60 En una segunda etapa de ensayo, los híbridos se comprobaron todavía una vez más después de su aislamiento tal como se ha descrito anteriormente, en el mismo formato de ensayo.

1d) Clonación

65 Células individuales de híbridos, que producen anticuerpos específicos para la MR I de la FSAP, se clonaron con un micromanipulador (de Leitz Messtechnik GmbH, Alemania). Los materiales sobrenadantes de cultivo de estos clones se purificaron tal como se describe dentro de 1g) y se caracterizaron más detalladamente tal como se describe dentro

ES 2 308 353 T3

de 1e), 1h) y 1i). Unos anticuerpos conformes al invento, que se fijan al epítopo específico para la MR I de la FSAP, se producen por ejemplo de los clones

- 5 a) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 9/014 (1),
- b) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 91 026 (2),
- c) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 351 05 (1),
- 10 d) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 34/08 (2) y
- e) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 151/013 (2)

15 Estos linajes de células de hibridoma se depositaron en la DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, con los números de entrada a) DSM ACC2675, b) DSM ACC2676, c) DSM ACC2674, d) DSM ACC2725 y e) DSM ACC2726.

20 1e) *Determinación de la subclase de anticuerpos*

La subclase de los anticuerpos contra la variante de Marburg I de la FSAP se determinó con ayuda del estuche IsoStrip®-Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit de Boehringer Mannheim, Alemania. Se determinaron las siguientes subclases.

- 25 a) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 9/014 (1), - subclase: IgG2a,
- b) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 91 026 (2), - subclase: IgG2a,
- c) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 351 05 (1), - subclase: IgG2b,
- d) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 34/08 (2) - subclase: IgG 1,
- 30 e) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 151/013 (2) - subclase: IgG1.

35 1f) *Producción de los anticuerpos*

40 Para la producción de unas cantidades mayores de anticuerpos se transfieren los correspondientes clones de células a frascos rodantes (de Corning Costar GmbH, Alemania), y se expanden a +37°C hasta alcanzar el volumen final deseado. Después de esto, la suspensión del cultivo rodante se filtró a través de 0,22 µm, a fin de eliminar las células. La solución de anticuerpos, que está ahora exenta de células, se concentra a través de un ultrafiltro (límite de separación 30.000 dalton) y a continuación se purifica.

45 1g) *Purificación de los anticuerpos*

La solución de anticuerpos obtenida se cambia de taponamiento con un tampón de fosfato 0,14 M de pH 8,6, y se aplica sobre una columna de cromatografía cargada con rProtein A Sepharose® Fast Flow (de Amersham Biosciences Europe GmbH, Alemania) (por cada 10 mg del anticuerpo que se ha de purificar, se emplea 1 ml de rProtein A Sepharose® Fast Flow). Todos los componentes no fijados se eliminan mediante lavado de la columna con un tampón de fosfato 0,14 M de pH 8,6. El anticuerpo fijado se eluye desde la columna con ácido cítrico 0,1 M de pH 3,0 y se dializa frente a acetato de sodio 0,05 M + NaCl 0,5 M + Tris 0,05 M + aziduro de sodio al 0,01% de pH 7,0.

55 1h) *Selección de anticuerpos adecuados para un ELISA de emparedado de Marburg I de la FSAP*

Se investigó la reacción de los anticuerpos monoclonales anti-Marburg I de la FSAP con el epítopo específico para MR I de la FSAP [péptido con la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3).] o respectivamente con el correspondiente epítopo de la FSAP del tipo salvaje [péptido con la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Gly-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 6)].

Reacción con un péptido específico para MR I de la FSAP

Como fase sólida se utiliza una placa de microtitulación, que está revestida con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3). Los anticuerpos anti-MR I de la FSAP procedentes de los materiales sobrenadantes de cultivo, se incuban en ella. Después de una etapa de lavado, se detecta una fijación del anticuerpo al péptido a través de un conjugado, que se compone de anticuerpos polyclonales anti-ratón de conejo y de la enzima peroxidasa, con una subsiguiente reacción cromática.

ES 2 308 353 T3

Reacción con un péptido de la FSAP de tipo salvaje

Como fase sólida se utiliza una placa de microtitulación, que está revestida con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Gly-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 6). Los anticuerpos anti-MR I de la FSAP procedentes de los materiales sobrenadantes de cultivo se incuban en ella. Después de una etapa de lavado, se detecta una fijación del anticuerpo al péptido a través de un conjugado, que se compone de anticuerpos policlonales anti-ratón de conejo y de la enzima peroxidasa, con una subsiguiente reacción cromática.

Se seleccionaron aquellos anticuerpos, que mostraban una reacción con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Gly-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3) (variante de Marburg I de la FSAP), pero que simultáneamente no reaccionaban con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Gly-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 6). (FSAP de tipo salvaje). La idoneidad de estos anticuerpos para su utilización como anticuerpos en fase sólida se investigó en un ELISA de emparedado con un anticuerpo conjugado específico para MR I de la FSAP, que es acoplado con la peroxidasa de rábano rusticano con un procedimiento conocido para un experto en la materia (p.ej. la conjugación de Nakane).

La comprobación de la idoneidad se efectuó en el ELISA de emparedado, tal como se ha descrito en el Ejemplo 3a). Los criterios de decisión esenciales para la idoneidad fueron una diferenciación inequívoca entre la variante de Marburg I de la FSAP y la FSAP de tipo salvaje, es decir una alta generación de señales con muestras que llevan la variante de Marburg I de la FSAP, y ninguna, o sólo una baja, generación de señales con muestras de la FSAP de tipo salvaje. El tipo preferido de muestra es un plasma al citrato. Otros criterios son el límite inferior de detección, y la linealidad de la curva de calibración.

Los anticuerpos producidos por los clones

- 25 a) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 9/014 (1) (DSM ACC2675),
- b) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 91 026 (2) (DSM ACC2676),
- 30 c) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 351 05 (1) (DSM ACC2674),
- d) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 34/08 (2) (DSM ACC2725) y
- e) MAK (de ratón) dirigido contra ECE-KLH 2004 - 151/013 (2) (DSM ACC2726)

35 mostraron los mejores resultados en lo que respecta a estos criterios.

Ejemplo 2

Detección de la variante de Marburg I de la FSAP en una muestra

2a) Procedimiento de ensayo ELISA de emparedado

45 Unos anticuerpos anti-FSAP conjugados con una peroxidasa se emplearon en combinación con los anticuerpos anti-Marburg I de la FSAP monoclonales, conformes al invento, en un inmunoensayo enzimático según el principio de emparedado.

50 Durante la primera incubación, la variante de antígeno de Marburg I de la FSAP, contenida en la muestra, - siempre y cuando que esté presente - se fija a los anticuerpos conformes al invento, dirigidos contra la Marburg I de la FSAP, que están fijados junto a la superficie de los pocos de una placa de microtitulación. Después de haber lavado los pocos, en una segunda reacción de fijación se utilizan unos anticuerpos anti-FSAP conjugados con una peroxidasa, que están dirigidos contra un epítopo arbitrario de la variante de Marburg I de la FSAP o respectivamente de la proteína FSAP de tipo salvaje, tal como p.ej. los que son formados por uno de los linajes de células de hibridoma DSM ACC2453 o DSM ACC2454 (véase el documento EP 1.182.258 A1). Se separan por lavado los anticuerpos conjugados con enzimas en exceso. A continuación, se determina la actividad de la enzima fijada en los pocos. La reacción enzimática de peróxido de hidrógeno y tetrametil-bencidina se interrumpe mediante una adición de ácido sulfúrico diluido. La intensidad cromática, que es proporcional a la concentración del antígeno de la MR I de la FSAP, se determina fotométricamente a una longitud de onda de 450 nm, y o bien se evalúa cualitativamente a través de un corte (cut off) o se cuantifica con ayuda de una curva de calibración a partir de unos patrones. Un tal inmunoensayo de emparedado conforme al invento detecta específicamente a la variante de Marburg I de la FSAP en solamente un procedimiento de ensayo.

65 Los resultados se representan en la Tabla 1. La reacción cromática significativa en las muestras, que proceden de voluntarios heterocigóticos con un polimorfismo de Marburg I de la FSAP, muestra que la utilización de los anticuerpos conformes al invento hace posible una determinación específica y confiable de la variante de Marburg I de la FSAP.

ES 2 308 353 T3

2b) Procedimiento de ensayo LOCI®

El principio de medición de la tecnología LOCI® está basado en la quimioluminiscencia provocada por radicales de oxígeno. Una premisa es en este caso una proximidad espacial, proporcionada por el complejo entre un antígeno y 5 un anticuerpo, de los componentes reactivos (p.ej. entre partículas de látex quimioluminiscentes y partículas de látex fotosensibles).

Un anticuerpo anti-FSAP, conjugado con biotina, se empleó en combinación con los anticuerpos anti-Marburg I de 10 la FSAP monoclonales, conformes al invento, en un LOCI® homogéneo según el principio de emparejamiento. Durante la primera incubación, la variante del antígeno de Marburg I de la FSAP, que está contenida en la muestra, - siempre y cuando que esté presente - se fija a los anticuerpos conformes al invento, dirigidos contra la Marburg I de la FSAP, que están fijados a la superficie de las partículas quimioluminiscentes, las cuales contienen una olefina. Después de una adición del anticuerpo anti-FSAP conjugado con biotina y de una incubación durante 7 minutos a +37°C, se añaden unas partículas fotosensibles de látex, sobre cuya superficie está fijada estreptavidina. Si está contenida en la muestra 15 la variante del antígeno de Marburg I de la FSAP, entonces las partículas quimioluminiscentes de anti-MR I de la FSAP, los anticuerpos anti-FSAP conjugados con biotina y las partículas fotosensibles de látex y de estreptavidina forman un complejo espacialmente próximo. Las partículas fotosensibles de látex, al ser excitadas con una luz que tiene una longitud de onda de 680 nm, liberan oxígeno singulete de vida corta, el cual inicia seguidamente una señal de luminiscencia/fluorescencia (520-620 nm) de las partículas quimioluminiscentes fijadas por el complejo de un antígeno 20 y un anticuerpo. El oxígeno singulete alcanza mediante su inestabilidad sólo a las partículas quimioluminiscentes, que se encuentran en proximidad directa (< 200 nm) con respecto de las partículas de látex fotosensibles. La luz emitida es medida con un aparato Tecan RSP 150 modificado, que tiene una unidad de detección de luminiscencia incorporada (on board) [Ullman y colaboradores (1994), Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5426-5430; Ullman y colaboradores (1996) Clinical Chemistry, 42: 1518-1526].

2c) Detección de la variante de Marburg I de la FSAP en muestras de pacientes

Con ayuda del procedimiento descrito dentro de 2a), se investigaron 10 muestras de plasma, con ayuda del procedimiento descrito dentro de 2b) se investigaron 84 muestras de plasma de voluntarios genotipificados previamente. 30 5 muestras procedían de unos voluntarios, que en una copia de gen en la posición de nucleótidos 1.601 de la región codificadora del gen de la FSAP (siendo 1 la "A" del codón de iniciación) tenían una transición de G/A, y que por consiguiente eran portadores heterocigóticos del polimorfismo de MR I de la FSAP, que en el plano de los aminoácidos conduce a un intercambio de aminoácidos Gly/Glu en la posición 534 de la proenzima (Gly/Glu 534). Otras 5 muestras procedían de unos voluntarios, que en la posición de nucleótidos 1.601 de la región codificadora del gen de la FSAP no tenían ninguna mutación, sino que en ambas copias del gen tenían la secuencia génica de tipo salvaje (G). 35

Como se desprende de las Tablas 1 y 2, la utilización de un anticuerpo conforme al invento en un ELISA de emparejamiento o en un ensayo LOCI® hace posible la diferenciación inequívoca entre muestras positivas y negativas para la MR I de la FSAP. En el ensayo LOCI® son especialmente adecuados los anticuerpos monoclonales, que están 40 formados por los linajes de células de hibridoma DSM ACC2725 y DSM ACC2726. Como valor de corte en el ensayo LOCI® se estableció una señal de 300.000 cómputos.

TABLA 1

Nº de la muestra	Genotipo en la posición de nucleótido 1.601	OD _{450 nm}
10.048	G/G	0,011
10.032	G/G	0,015
10.033	G/G	0,016
10.029	G/G	0,021
10.045	G/G	0,015
14.942	G/A	1,625
14.943	G/A	1,723
7.020.552	G/A	1,723
10.047	G/A	1,533
7.020.538	G/A	1,441

ES 2 308 353 T3

TABLA 2

	ID de la muestra	Genotipo de la posición de nucleótido 1.601	Cómputos		ID de la muestra	Genotipo de la posición de nucleótido 1.601	Cómputos
5	1	G/G	8.900		43	G/G	25.400
10	2	G/A	1.750.000		44	G/G	12.400
15	3	G/G	12.500		45	G/G	31.200
20	4	G/G	4.800		46	G/G	22.200
25	5	G/G	9.800		47	G/G	8.600
30	6	G/G	19.300		48	G/A	1.821.000
35	7	G/G	22.100		49	G/G	5.300
40	8	G/G	35.100		59	G/G	7.600
45	9	G/G	8.900		51	G/G	9.400
50	10	G/G	7.800		52	G/G	5.900
55	11	G/G	6.600		53	G/G	7.800
60	12	G/G	8.800		54	G/G	8.800
65	13	G/G	4.100		55	G/G	24.500
	14	G/G	7.700		56	G/G	21.500
	15	G/G	8.500		57	G/G	27.400
	16	G/G	4.700		58	G/G	23.300
	17	G/G	8.900		59	G/G	14.600
	18	G/G	5.600		60	G/G	7.300
	19	G/G	7.500		61	G/G	5.600
	20	G/G	6.900		62	G/G	9.600
	21	G/G	15.300		63	G/G	6.700
	22	G/G	14.200		64	G/G	31.400
	23	G/G	8.600		65	G/G	1.250.000
	24	G/G	5.600		66	G/G	8.300
	25	G/G	4.500		67	G/G	7.900
	26	G/G	7.700		68	G/G	6.900
	27	G/G	5.900		69	G/G	4.900
	28	G/G	7.500		70	G/G	8.800
	29	G/G	7.300		71	G/G	15.400
	30	G/G	9.600		72	G/G	18.800
	31	G/G	13.400		73	G/G	7.700

ES 2 308 353 T3

ID de la muestra	Genotipo de la posición de nucleótido 1.601	Cómputos		ID de la muestra	Genotipo de la posición de nucleótido 1.601	Cómputos
32	G/G	7.600		74	G/G	8.300
33	G/G	8.500		75	G/G	5.700
34	G/G	7.700		76	G/A	1.479.000
35	G/G	6.400		77	G/G	7.800
36	G/G	5.600		78	G/G	8.800
37	G/G	7.600		79	G/G	9.400
38	G/G	9.100		80	G/G	5.800
39	G/G	7.300		81	G/G	6.400
40	G/G	9.800		82	G/G	7.600
41	G/G	4.900		83	G/G	8.200
42	G/G	8.500		84	G/G	6.900

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido que se compone de 5 a 25 aminoácidos, de manera preferida de 5 a 20 aminoácidos, de manera muy especialmente preferida de 10 a 15 aminoácidos, **caracterizado** porque contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1), pero no se compone de la secuencia de aminoácidos Ser-Thr-Lys-Lys-Leu-Ser-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Ile-Gly-Asp-Glu-Leu-Asp-Ser-Asn-Met.
- 10 2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1 con la secuencia de aminoácidos Ser-Trp-Gly-Leu-Glu-Cys-Glu-Lys-Arg-Pro-Gly-Val-Tyr (SEQ ID NO. 3) o un fragmento de la misma, que contiene por lo menos la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1).
- 15 3. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** porque está acoplado a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Leu-Lys-Lys-Glu-Glu-Phe-His-Glu-Gln-Ser-Phe-Arg-Val (SEQ ID No. 5) o a un fragmento del mismo, que contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Glu-Phe-His-Glu (SEQ ID NO. 4).
- 20 4. Péptido de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque el péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Cys-Glu-Lys-Arg (SEQ ID NO. 1) y el péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Glu-Glu-Phe-His-Glu (SEQ ID NO. 4) están unidos a través de un reticulante hetero- u homobifuncional.
- 25 5. Péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 4, estando **caracterizado** éste porque está asociado con una fase sólida y/o con un componente de un sistema que forma señales.
- 30 6. Utilización de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 para la purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.
- 35 7. Utilización de un péptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 en un procedimiento *in vitro* para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito, de manera preferida la variante de Marburg I de la FSAP.
- 40 8. Anticuerpo, estando **caracterizado** éste porque se fija específicamente al epítopo caracterizante de la variante de Marburg I de la FSAP y a un péptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 2.
- 45 9. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, estando **caracterizado** éste porque es un anticuerpo monoclonal o policlonal.
- 50 10. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-9, estando **caracterizado** éste porque es producido por uno de los linajes de células de hibridoma DSM ACC2674, DSM ACC2675, DSM ACC2676, DSM ACC2725 o DSM ACC2726.
- 55 11. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-10 estando **caracterizado** el anticuerpo porque está asociado con una fase sólida y/o con un componente de un sistema que forma señales.
- 60 12. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-10 en un medio de inyección estéril, farmacéuticamente compatible.
- 65 13. Utilización de un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11 en un procedimiento para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito, de manera preferida de la variante de Marburg I de la FSAP, en una muestra.
- 70 14. Utilización de un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11 en un ensayo de fijación homogéneo para la detección cuantitativa o cualitativa de un analito, de manera preferida de la variante de Marburg I de la FSAP, en una muestra.
- 75 15. Utilización de un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11 en la cromatografía de afinidad.
- 80 16. Utilización de un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11 como agente de diagnóstico o como componente de un agente de diagnóstico.
- 85 17. Reactivo que contiene uno o varios péptidos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 y/o uno o varios anticuerpos de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11.
- 90 18. Estuche de ensayo que contiene un reactivo, el cual contiene uno o varios péptidos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 y/o uno o varios anticuerpos de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11.
- 95 19. Estuche de ensayo de acuerdo con la reivindicación 18, que contiene adicionalmente una agrupación de plasmas de Marburg I de la FSAP.

ES 2 308 353 T3

20. Célula animal, vegetal, fúngica o procariótica, así como una célula humana aislada, estando **caracterizada** ésta porque produce anticuerpos de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-10.

21. Linaje de células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 20.

5 22. Linajes de células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 21, que se habían depositado en la DSMZ bajo los números de entrada DSM ACC2675, DSM ACC2676, DSM ACC2674, DSM ACC2725 o DSM ACC2726.

10 23. Procedimiento para la detección cuantitativa o cualitativa de la variante de Marburg I de la FSAP en una muestra mediando utilización de uno o varios péptidos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 y/o de uno o varios anticuerpos de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11.

15 24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, **caracterizado** porque se utilizan anticuerpos de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11 en combinación con anticuerpos, que se fijan a epítopos de la variante de Marburg I de la FSAP, que ciertamente son específicos, pero que no **caracterizantes** para la variante de Marburg I de la FSAP.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 353 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dade Behring Marburg GmbH
5 <120> **Anticuerpos dirigidos contra el polimorfismo de Marburg I de la proteasa activadora del factor VII (FSAP), su producción y su utilización**
10 <130> 2004/B002J-Ma1261
<150> DE 10 2004 041 104.2
<151> 2004-08-24
15 <150> DE 10 2005 026 163.9
<151> 2005-06-06
<160> 6
20 <170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
25 <211> 5
<212> PRT
<213> secuencia artificial
30 <220>
<223> oligopéptidos
35 <400> 1

Glu Cys Glu Lys Arg

1 5

40 <210> 2
<211> 25
<212> PRT
45 <213> secuencia artificial

<220>
<223> oligopéptidos
50 <400> 2

55 **Tyr Val Tyr Gly Ile Val Ser Trp Gly Leu Glu Cys.Glu Lys Arg Pro**
1 5 10 15

60 **Gly Val Tyr Thr Gln Val Tyr Lys Phe**
20 25

65 <210> 3
<211> 13
<212> PRT

ES 2 308 353 T3

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> oligopéptidos

<400> 3

10 **Ser Trp Gly Leu Glu Cys Glu Lys Arg Pro Gly Val Tyr**
 1 5 10

15 <210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> oligopéptidos

25 <400> 4

Glu Glu Phe His Glu

30 **1 5**

<210> 5

<211> 15

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> oligopéptidos

<400> 5

45 **Gln Asp Leu Lys Lys Glu Glu Phe His Glu Gln Ser Phe Arg Val**
 1 5 10 15

50 <210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> secuencia artificial

55

<220>

<223> oligopéptidos

60 <400> 6

Ser Trp Gly Leu Glu Cys Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr

65 **1 5 10**