



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 346 618**

② Número de solicitud: 200802436

⑤ Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **14.08.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.10.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia
Avda. Teniente Flomesta, 5
30003 Murcia, ES**

⑦ Inventor/es: **Vicente García, Vicente;
Berenguer Pina, José Javier;
Yélamos López, José;
Corral de la Calle, Javier y
Ordóñez González, Adriana**

⑦ Agente: **Temño Ceniceros, Ignacio**

⑤ Título: **Anticuerpo monoclonal anti antitrombina citrulinada humana y sus usos.**

⑦ Resumen:

Anticuerpo monoclonal anti antitrombina citrulinada humana y sus usos.

Comprende un anticuerpo monoclonal que fija específicamente la antitrombina citrulinada humana, la línea de hibridoma productora de dicho anticuerpo monoclonal y el uso del anticuerpo para la detección cualitativa o cuantitativa la antitrombina citrulinada humana en una muestra biológica aislada del cuerpo. Se encuentra aplicación en el diagnóstico y pronóstico de distintas enfermedades en el que esta modificación post-traducciona forma parte del mecanismo patológico.

ES 2 346 618 A1

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti antitrombina citrulinada humana y sus usos.

5 La presente invención se encuadra principalmente en el área de la Inmunología, y el sector de aplicación sería el sanitario con fines diagnósticos y pronósticos en hemostasia y trombosis, reumatología, neurología y enfermedades inflamatorias.

Estado de la técnica anterior

10 La antitrombina es el anticoagulante endógeno más relevante en la hemostasia, de forma que su deficiencia completa es letal, y la deficiencia parcial incrementa de forma muy significativa el riesgo trombótico (Ishiguro y col. J Clin Invest. 2000; 106: 873-8).

15 Como el resto de las proteínas de la superfamilia de las serpinas a la que pertenece, la antitrombina se caracteriza por una gran flexibilidad estructural, crucial para su correcta funcionalidad, pero que la hace extremadamente sensible a diferentes factores tanto genéticos como ambientales (Hernández-Espinosa y col. Thromb Haemost. 2007; 98: 557-63).

20 Un de los factores que provocan la pérdida completa de la funcionalidad anticoagulante de la antitrombina es la citrulinación (Chang y col. Rheumatology. 2005; 44: 293-8; Pike y col. J Biol Chem. 1997; 272: 19652-5). Este proceso puede producirse en situaciones fisiopatológicas cuando las enzimas PAD, responsables de esta modificación post-traduccional, se liberan al plasma (György y col. Int J Biochem Cell Biol. 2006; 38: 1662-77). La cuantificación de la cantidad de antitrombina citrulinada en muestras biológicas humanas puede servir de marcador de riesgo trombótico y definir estrategias terapéuticas eficaces, especialmente en pacientes con elevada tasa de citrulinación descrita (Marini y col. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica (AAIC). 2004; 35: 39-45). Además, la detección y cuantificación de antitrombina citrulinada podría tener implicaciones adicionales tanto diagnósticas como pronosticas en enfermedades en las que la citrulinación forma parte del mecanismo patológico (artritis reumatoide, esclerosis múltiple, alzheimer, psoriasis, etc) (György y col. Int J Biochem Cell Biol. 2006; 38: 1662-77).

30 El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra modificaciones post-traduccionales de una proteína es complejo y no siempre se logra diferenciar la forma modificada.

35 En general, la citrulinación, como modificación post-traduccional, ha sido muy poco estudiada pese a jugar un papel relevante en diferentes patologías (artritis reumatoide, esclerosis múltiple, alzheimer, psoriasis). Hasta la fecha, su estudio en hemostasia ha sido anecdótico, a pesar de la relevancia funcional que causa en el principal anticoagulante, la antitrombina.

Hasta la fecha, en el contexto de esta modificación post-traduccional, se han desarrollado:

- 40
- i) anticuerpos anti-citrulina (Upstate, USA; Pike y col. J Biol Chem. 1997; 272: 19652-5);
 - ii) anticuerpos monoclonales frente a determinadas proteínas citrulinadas como las histonas (Senshu y col. Anal Biochem. 1992; 203: 94-100) o la queratina K1 (Senshu y col. J Dermatol Sci. 1999; 21: 113-26);
 - 45 iii) kits comerciales con péptidos cíclicos citrulinados de primera (CCP-1) segunda (CCP-2) y tercera generación (CCP-3) usados en el campo de la clínica para detectar anticuerpos anti-citrulina en enfermedades en las que la citrulinación forma parte del mecanismo patológico (Van Boekel y col. Arthritis Res. 2002; 4: 87-93; Mimori y col. Intern Med. 2005; 44: 1122-6, Lutteri y col. Clin Chim Acta. 2007; 386: 76-81).
- 50

Pese a la existencia de anticuerpos policlonales dirigidos contra la antitrombina (Dako, A0296), anticuerpos generados frente a posibles modificaciones post-traduccionales de esta molécula son nulos.

55 Existe por tanto una necesidad de disponer de anticuerpos monoclonales específicos frente a antitrombina citrulinada humana.

Explicación de la invención

60 Son objeto de la presente invención un anticuerpo monoclonal anti antitrombina citrulinada humana, así como la línea de hibridoma empleada en su preparación, y el uso de dicho anticuerpo.

La presente invención describe la generación, en ratones Balb/c, de un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente moléculas de antitrombina humana portadoras de una modificación post-traduccional, la citrulinación.

65 Un segundo aspecto de la invención se refiere a la línea de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales anti antitrombina citrulinada humana. Dicha línea de hibridoma ha sido depositada el día 06 de Junio de 2008 en la European Collection of Cell Cultures (ECACC) de acuerdo con las condiciones del Tratado de Budapest sobre

el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Procedimientos de Patente, y ha recibido el número de depósito 08060601.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, ésta se refiere al uso del anticuerpo monoclonal de la invención en la detección y cuantificación de moléculas de antitrombina citrulinada humana en muestras biológicas aisladas del cuerpo. En dicho procedimiento se utiliza un anticuerpo monoclonal específico que reconoce la antitrombina humana citrulinada aplicado a diferentes métodos de detección (western-blott de geles en condiciones nativas, o ELISA).

10 Así, la invención proporciona un método para detectar antitrombina citrulinada humana en un fluido corporal o preparación aislado del cuerpo conteniendo dicha antitrombina citrulinada humana, caracterizado porque dicho método comprende:

15 i) poner en contacto dicho fluido corporal o preparación aislado del cuerpo con el anticuerpo monoclonal de la invención; y

ii) detectar la cantidad de anticuerpo monoclonal unido, la cantidad de anticuerpo monoclonal libre, o ambos.

20 La determinación de la cantidad de anticuerpo monoclonal unido, la cantidad de anticuerpo monoclonal libre o ambas se puede realizar, de manera preferida, mediante ELISA o western-blott de geles en condiciones nativas.

25 Según otro aspecto de la presente invención, ésta proporciona el uso del anticuerpo monoclonal de la invención en el diagnóstico y pronóstico de distintas enfermedades en el que esta modificación post-traducciona forma parte del mecanismo patológico. Preferentemente, dicha enfermedad se selecciona entre el grupo formado por una enfermedad hemostásica, trombótica, reumatológica, neurológica e inflamatoria.

30 Así, según una realización preferida de la presente invención, ésta proporciona el uso del anticuerpo monoclonal de la invención en el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad que se selecciona entre artritis reumatoide, esclerosis múltiple, alzheimer y psoriasis.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Descripción de las figuras

35 Figura 1: La figura 1 muestra el wester-blott del gel que separa, en condiciones nativas, la antitrombina normal no modificada (ATn) y antitrombina citrulinada (ATc) empleando el anticuerpo monoclonal anti-antitrombina citrulinada.

40 Figura 2: Variación de la absorbancia medida a una longitud de onda de 492 nm en muestras biológicas en función de la concentración de antitrombina citrulinada (ng/ml).

45 Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Exposicion detallada de modos de realización

Ejemplo 1

50 Citrulinación *in vitro* de la antitrombina humana

55 La antitrombina humana se citrulinó *in vitro* siguiendo el procedimiento indicado previamente (Pike y col. J Biol Chem. 1997; 272: 19652-5). Brevemente, la antitrombina se incubó con la enzima peptidilarginina deiminasa procedente de músculo esquelético de conejo en una relación 50:1 (antitrombina:PAD) durante 24 horas a 37°C en 100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.4. La reacción fue frenada con EDTA 50 mM.

La citrulinación de la antitrombina fue verificada por tres métodos:

- 60 1) Confirmación de la pérdida de la actividad anti-Xa de la antitrombina asociada a la citrulinación (Chang y col. Rheumatology. 2005; 44: 293-8; Pike y col. J Biol Chem. 1997; 272: 19652-5). Para ello, empleamos un sistema cromogénico con FXa bovino y sustrato cromogénico de factor Xa (Instrumentation Laboratory; Milano, Italy).
- 65 2) Cambios electroforéticos de la proteína citrulinada discriminados en geles de poliacrilamida tanto en condiciones desnaturizantes (SDS) como no desnaturizantes.
- 3) Detección directa de citrulininas (argininas citrulinadas) en la proteína por métodos proteómicos (espectrometría de masas, masas/masas en tándem).

ES 2 346 618 A1

Citrulinación in vitro de la albúmina sérica bovina (BSA)

Para comprobar la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-antitrombina humana citrulinada generado, se citrulinó albúmina bovina *in vitro* siguiendo el mismo procedimiento descrito para la citrulinación de la antitrombina. Brevemente, albúmina bovina, proteína similar a la antitrombina tanto en porcentaje de residuos arginina como en tamaño, se incubó con la enzima peptidilarginina deiminasa en una relación 50:1 (albumina:PAD) durante 24 horas a 37°C siendo la reacción frenada con EDTA 50 mM.

Generación del hibridoma

Un total de tres ratones fueron inmunizados con tres inyecciones intraperitoneales cada 15 días con 50 µg de antitrombina citrulinada (antígeno). El antígeno se emulsionó con adyuvante completo de Freund (CCF, Sigma F-5881) en la primera inyección, y con adyuvante incompleto de Freund (CIF, Sigma F-5506) en las dos siguientes inyecciones intraperitoneales. La inmunización final consistió en una inyección intravenosa o intraesplénica de 50 µg de antígeno sin el adyuvante. Para la emulsión se realizó una mezcla de antígeno y adyuvante siguiendo una proporción del 1:1.2. El volumen final de cada inyección fue de 300 a 500 µl.

Tres días después, se extrajo el bazo de los ratones y las células se fusionaron con la línea celular de mieloma murino X63, desarrollada a partir de ratones Balb/c no secretores de inmunoglobulinas (Kearney y col. J Immunol. 1979; 123: 1548-50) utilizando polietilenglicol en solución al 50% (Sigma) (5). Los hibridomas fueron seleccionados mediante su crecimiento en medio RPMI 1640 (Biowhitaker) que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), que complementó con suero fetal bovino al 10% (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), piruvato 1 mM (Sigma), y penicilina/streptomycin 1% (Gibco). En medio HAT, sólo crecen las células híbridas, aquellas formadas por linfocitos B y células de mieloma ya que en medio con aminopterina sólo crecen los híbridos que gracias a los linfocitos B poseen todo el panel de enzimas de las vías de rescate de síntesis del DNA y que por lo tanto utilizan la Hipoxantina y Timidina del medio. Finalmente, los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para comprobar la presencia de hibridomas secretores de inmunoglobulinas anti-antitrombina citrulinada. Los hibridomas positivos se clonaron mediante dilución límite y fueron expandidos y congelados en nitrógeno líquido.

Identificación del anticuerpo monoclonal específico anti-antitrombina humana citrulinada

La selección del anticuerpo específico anti-antitrombina humana citrulinada se realizó analizando los sobrenadantes de los hibridomas generados mediante ELISA indirecto empleando tanto la proteína no modificada como la citrulinada. Para ello, microplacas de 96 pocillos de fondo plano Greiner (Bio-one, 650001), se incubaron con 50 µl de antitrombina citrulinada y antitrombina no citrulinada (580 ng/ml) en buffer salino (PBS) pH 7,4 durante toda la noche, a 4°C, para permitir la correcta adhesión de las proteínas a la placa. Posteriormente las placas fueron lavadas con 100 µl de PBS/Tween 20 al 0.05% y bloqueadas durante 30 minutos a 37°C con 100 µl de buffer de bloqueo (KH₂PO₄ 2 mM, NaHPO₄ 10 mM, BSA 0.15 mM y 0.05% de Tween-20). A continuación, las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C, con 50 µl por pocillo de cada sobrenadante procedente de los hibridomas. Seguidamente, se realizaron tres lavados con PBS/Tween 20 al 0.05%. Entonces, se añadió 100 µl por pocillo de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Horseadish Peroxidase (Amersham, Biosciences, UK) a una dilución 1:8000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 6 lavados con PBS/Tween 20 al 0.05% para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añadió el sustrato enzimático en solución (OPD 10 mg/25 mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; con peróxido de hidrógeno 30%). Se dejó reaccionar durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción fue finalmente frenada con 50 µl H₂SO₄ 4N, midiendo la absorbancia (OD) en un espectrofotómetro (BioTek) a una longitud de onda de 492 nm.

Como control de especificidad adicional, empleamos BSA no citrulinada y BSA citrulinada. Para ello pocillos de microplacas de 96 pocillos de fondo plano Greiner, fueron incubados con 50 µl de proteína BSA, no modificada y citrulinada, a la misma concentración que la usada para la antitrombina. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento de ELISA indirecto descrito anteriormente para la antitrombina no citrulinada/citrulinada.

Esta técnica permitió seleccionar el hibridoma 3B6, B4ii (número de depósito 08060601) por ser productor de un anticuerpo monoclonal que detecta específicamente la antitrombina citrulinada, pero no reconoce ni la antitrombina no citrulinada ni otras proteínas citrulinadas.

A continuación confirmamos mediante inmunoblotting de geles nativos, tanto la especificidad del mismo por la antitrombina citrulinada como la utilidad del anticuerpo para ser empleado con esta metodología (Figura 1). Utilizamos geles de acrilamida al 8% en condiciones no desnaturalizantes (native-PAGE) de acuerdo a trabajos previos (Bruce y col. J Clin Invest. 1994; 94: 2265-74). Posteriormente las proteínas, 335 ng de antitrombina no citrulinada (control negativo ATn) y 335 ng de antitrombina citrulinada (ATc), fueron separadas por electroforesis del gel, transferidas a una membrana de PVDF y reveladas utilizando el anticuerpo monoclonal específico para la antitrombina citrulinada (3B6, B4ii). Tras tres lavados con PBS/Tween 20 la membrana, fue incubada con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Horseadish Peroxidase (Amersham, Biosciences, UK). Finalmente, la actividad peroxidasa fue detectada utilizando el kit ECL de revelado (Amersham Biosciences Ltd, Little Chalfont, UK). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

ES 2 346 618 A1

Análisis por ELISA de antitrombina citrulinada en muestras biológicas

El anticuerpo monoclonal anti-antitrombina citrulinada, generado para la detección específica de esta modificación post-traduccional en la antitrombina nos permitió, mediante la técnica de ELISA Sándwich, cuantificar el grado de citrulinación de la antitrombina en muestras biológicas.

En primer lugar, microplacas de 96 pocillos de fondo plano Greiner (Bio-one, 650001) se sensibilizaron con 50 μ l del anticuerpo de captura del antígeno problema (anticuerpo policlonal de conejo anti-antitrombina; A0296, Dako) diluido 700 veces en buffer bicarbonato 0.05M pH: 9.2 durante toda la noche, a 4°C. Transcurrido este tiempo, y para eliminar los anticuerpos de captura no absorbidos a los pocillos, las placas se lavaron 3 veces con 100 μ l de PBS/Tween 20 al 0.05% y bloqueadas durante 30 minutos a 37°C con 100 μ l de buffer de bloqueo (KH₂PO₄ 2 mM, NaHPO₄ 10 mM, BSA 0.15 mM y 0.05% de Tween-20). A continuación, las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C, con 50 μ l por pocillo de cada muestra biológica (plasma o líquido sinovial) a una dilución 1:200 en PBS pH: 7.4. El antígeno (antitrombina no citrulinada y citrulinada) no capturado por el anticuerpo se eliminó lavando la placa de nuevo con 100 μ l de PBS/Tween 20 al 0.05%. A continuación las placas se incubaron con 50 μ l del anticuerpo monoclonal específico anti-antitrombina citrulinada, a una dilución 1:800 en buffer de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Seguidamente, se realizaron tres lavados con PBS/Tween 20 al 0.05% y se añadió 100 μ l por pocillo de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Horseadfish Peroxidase (Amersham, Biosciences, UK) a una dilución 1:8000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 6 lavados con PBS/Tween 20 al 0.05% para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añadió el sustrato enzimático en solución (OPD 10 mg/25 mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; con peróxido de hidrógeno 30%). Se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

La reacción fue finalmente frenada con 50 μ l H₂SO₄ 4N, midiendo la absorbancia (OD) en un espectrofotómetro (BioTek, Synergy HT) a una longitud de onda de 492 nm. El control negativo consistió en una serie de pocillos con buffer PBS en lugar de la muestra biológica (unión no específica del anticuerpo).

Para poder determinar la concentración de antitrombina citrulinada en las muestras biológicas realizamos una recta patrón (Figura 2) a partir de concentraciones conocidas de antitrombina purificada humana citrulinada.

En la Tabla 1 se recogen los valores observados de absorbancia a 492 nm de las distintas muestras analizadas cuando se realiza el ELISA con el anticuerpo anti-antitrombina citrulinada. La tabla también recoge los valores de las concentraciones de AT citrulinada en ng/ml calculados a partir de la curva patrón (Figura 2) en la cual se correlaciona concentraciones conocidas de antitrombina purificada citrulinada con una absorbancia concreta obtenida en el ELISA. Así se calculó la ecuación de la recta ($Y=0,1488 \cdot x-14,064$) y se calculó la concentración de proteína citrulinada en cada muestra problema en base a la absorbancia obtenida en el ELISA.

TABLA 1

Validación del ELISA

	Plasma A	Plasma A + AT citrulinada	Plasma A + BSA citrulinada	Plasma A + BSA No citrulinada	Control Negativo (PBS)
Absorbancia	113	900	110	111	52
AT citrulinada (ng/ml)	2,7504	119,856	2,304	2,4528	-6,3264

La cantidad de antitrombina citrulinada, BSA citrulinado y BSA no citrulinado añadido, así como la cantidad de antitrombina que se añade en la muestra de plasma es la siguiente:

Muestra del plasma A: 150 ng

Suplemento de AT citrulinada: 135 ng

Suplemento de BSA citrulinado: 113 ng

Suplemento de BSA no citrulinado: 113 ng.

ES 2 346 618 A1

Por otro lado, los valores de absorbancia a concentración creciente de antitrombina purificada citrulinada de la Figura 2 se recogen en la Tabla 2.

TABLA 2

Concentración AT citrulinada (ng/ml)	Absorbancia (492nm)
72,5	556
36,25	318,5
18,125	203,5
9,0625	141,5
5,53	120,5
2,26	106
1,13	96
0,565	95,5
0	89

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal, **caracterizado** porque fija específicamente la antitrombina citrulinada humana.

5

2. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque es formado por el linaje celular de hibridoma 3B6 depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest el día 06 de Junio de 2008 en la European Collection of Cell Cultures (ECACC) con el número de depósito 08060601.

10

3. La línea de hibridoma depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest el día 06 de Junio de 2008 en la European Collection of Cell Cultures (ECACC) con el número de depósito 08060601.

15

4. Uso de un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque éste se emplea para la detección cualitativa o cuantitativa de la antitrombina citrulinada humana en una muestra biológica aislada del cuerpo.

5. Método de obtención del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende las etapas:

20

i) inmunización de ratones con antitrombina citrulinada;

ii) fusionar células del bazo de los ratones con la línea celular de mieloma murino X63;

25

iii) hacer crecer las células de hibridoma resultantes;

iv) identificación y clonación de los hibridomas secretores de inmunoglobulinas anti-antitrombina citrulinada; y

30

v) uso de los hibridomas clonados para la producción de los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Un método para detectar antitrombina citrulinada humana en un fluido corporal o preparación aislado del cuerpo conteniendo dicha antitrombina citrulinada humana, **caracterizado** porque dicho método comprende:

35

i) poner en contacto dicho fluido corporal o preparación aislado del cuerpo con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1; y

ii) detectar la cantidad de anticuerpo monoclonal unido, la cantidad de anticuerpo monoclonal libre, o ambos.

40

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque comprende determinar la cantidad de anticuerpo monoclonal unido, la cantidad de anticuerpo monoclonal libre o ambas mediante ELISA o western-blot de geles.

45

8. Uso del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el diagnóstico y pronóstico de una enfermedad que se selecciona entre el grupo formado por una enfermedad hemostásica, trombótica, reumatológica, neurológica e inflamatoria.

50

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque la enfermedad se selecciona entre artritis reumatoide, esclerosis múltiple, alzheimer y psoriasis.

55

60

65

FIGURA 1

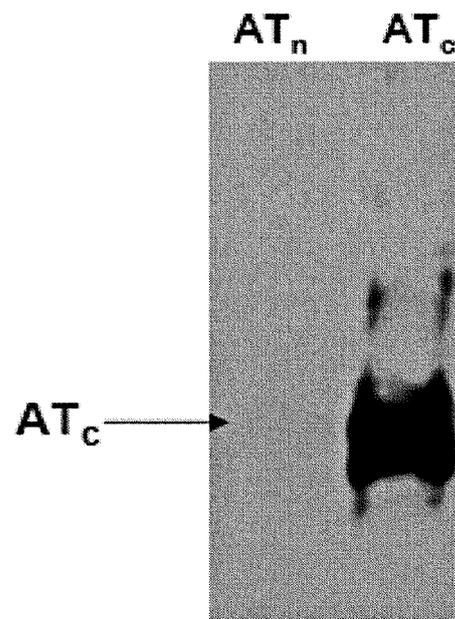
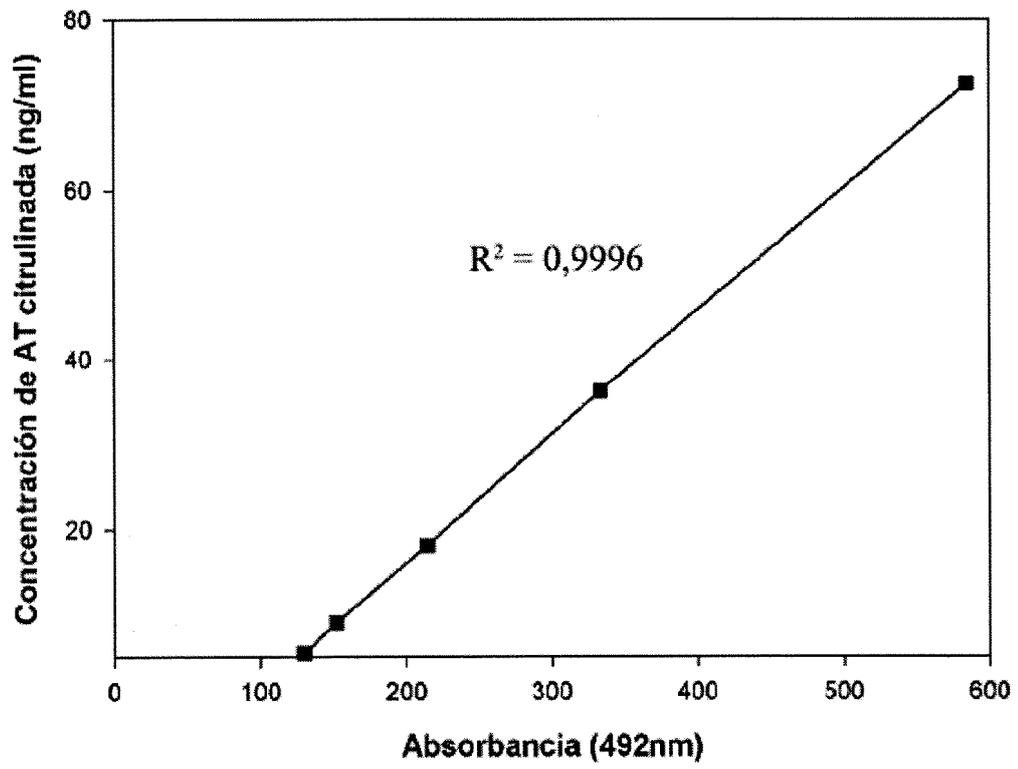


FIGURA 2





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 618

② Nº de solicitud: 200802436

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.08.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JP 2006133177 A (RIKAGAKU KENKYUSHO) 25.05.2006, Resumen de la base de datos WPI y párrafos 1,12-14,28,30-31. Recuperado de EPOQUE, número de acceso: 2006-368293 [38]	1,4,6-9
A	CHANG, X., YAMADA, R., SAWADA, T., SUZUKI, A., KOCHI, Y. y YAMAMOTO, K. "The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis." Rheumatology (2005) vol. 44, páginas 293-298. Páginas 293-294.	1-9
A	MEZZANO, V., LACOBELLI, S. "Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico." Reumatología (2007) vol. 23, páginas 137-141. Páginas 137-138.	1-9
A	AKARI SUZUKI, RYO YAMADA y KAZUHIKO YAMAMOTO. "Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis." Annals of the New York academic of Sciences (2007), páginas 323-339. Páginas 328-333.	1-9
A	MARINI, V., BABINI, A. y MORETTI, E. "Determinación de citrulina y óxido nítrico en el suero de pacientes con artritis reumatoidea y otras enfermedades reumáticas." Archivos de alergia e inmunología clínica (2004) vol. 34, páginas 39-45. Páginas 44-45.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.10.2010

Examinador

M. Jesús García Bueno

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, G01N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.10.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-3, 5	SÍ
	Reivindicaciones	1, 4, 6-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-3, 5	SÍ
	Reivindicaciones	1, 4, 6-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JP 2006133177 A	25-05-2006
D02	CHANG, X., YAMADA, T., SUZUKI, A., KOCHI, Y. AND YAMAMOTO, K. "The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis." <i>Rheumatology</i> (2005) Vol. 44, páginas 293-298.	2005
D03	MEZZANO, V., LACOBELLI, S. "Anticuerpos anti-peptido citrulinado cíclico." <i>Reumatología</i> (2007) Vol. 23, páginas 137-141.	2007
D04	AKARI SUZUKI, RYO YAMADA AND KAZUHIKO YAMAMOTO. "Citullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis." <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i> (2007) páginas 323-339.	2007
D05	MARINI, V., BABINI, A. AND MORETTI, E. "Determinación de citrulina y óxido nítrico en el suero de pacientes con artritis reumatoidea y otras enfermedades reumáticas." <i>Archivos de alergia e inmunología clínica</i> (2004) vol. 34, páginas 39-45.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un anticuerpo monoclonal que fija específicamente la antitrombina citrulinada humana, formado por el linaje celular del hibridoma 3B6, B4ii; dicha línea del hibridoma, y el uso del anticuerpo para la detección cualitativa y cuantitativa de la antitrombina citrulinada para el diagnóstico de enfermedades como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, alzheimer y psoriasis (reivindicaciones 1-4 y 8-9).

La presente solicitud de invención también consiste en un método de obtención del anticuerpo y el método de detección de antitrombina citrulinada en un fluido corporal (reivindicaciones 5-7).

El documento D01 divulga un diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide mediante la utilización de la antitrombina citrulinada 3 por la peptidil arginina deaminasa 4 (PADI4) en el diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide.

El documento D02 divulga el uso de un anticuerpo monoclonal que fija específicamente la antitrombina humana junto con un anticuerpo anticitrulina para la detección en sangre del nivel de citrulinación de la antitrombina mediante sándwich ELISA para el diagnóstico de la artritis, y el uso de un anticuerpo anticitrulina mediante las técnicas ELISA o western-blot (ver página 293-294).

El documento D03 divulga el uso de anticuerpos antipeptido citrulinado cíclico (anti-CCP) como marcadores para el pronóstico de la artritis reumatoide (ver resumen y páginas 137-138)

El documento D04 divulga que las proteínas citrulinadas y los anticuerpos antiproteínas citrulinadas juegan un papel importante en el desarrollo de la artritis reumatoide (ver introducción y páginas 328-333).

El documento D05 divulga el nivel de citrulinemia como marcador temprano de evolución de la artritis reumatoide (ver página 44-45).

Hoja adicional

1.- NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).

1.1.- Reivindicaciones 1, 4, 6-9:

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 1, 4, 6-9 y divulga un anticuerpo monoclonal que fija específicamente la antitrombina 3 citrulinada humana, formado por un hibridoma y el uso del anticuerpo para la detección cualitativa y cuantitativa de la antitrombina citrulinada para el diagnóstico de la artritis reumatoide. El documento D01 también divulga un método de detección de antitrombina citrulinada en sangre o líquido sinovial mediante la técnica ELISA o western-blot (ver resumen y párrafos 1, 12-14, 28, 30-31).

Las características de las reivindicaciones 1, 4, 6-9 ya son conocidas del documento D01. Por lo tanto estas características no son nuevas ni implican actividad inventiva a la vista del estado de la técnica conocido según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

1.2.- Reivindicaciones 2-3, 5:

No sería obvio para una persona experta en la materia aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención como se revela en las reivindicaciones 2-3 y 5. Por lo tanto, el objeto de estas reivindicaciones cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.