



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 369**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05824356 .9**

96 Fecha de presentación : **22.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1853921**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Detección de un anticuerpo terapéutico en un animal de experimentación.**

30 Prioridad: **23.12.2004 EP 04030545**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Lenz, Helmut y**
Stubenrauch, Kay-Gunnar

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 360 369 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de un anticuerpo terapéutico en un animal de experimentación

5 La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos terapéuticos. Se refiere especialmente al estudio de anticuerpos terapéuticos en un animal de experimentación. La presente invención da a conocer un método para detectar un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación que comprende las etapas de a) proporcionar la muestra a analizar, b) incubar dicha muestra con un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y que no se une a las inmunoglobulinas de dicho animal de experimentación, c) 10 opcionalmente incubar dicha muestra con un reactivo adecuado para la detección selectiva del anticuerpo total, activo o unido al antígeno y d) correlacionar el complejo formado en (b) o (c) con la concentración de dicho anticuerpo terapéutico. También hace referencia a la utilización de un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas de un animal de experimentación para determinar la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido al antígeno en una muestra obtenida de un animal de 15 experimentación.

Desde el desarrollo de los primeros anticuerpos monoclonales por Koehler y Milstein en 1974 se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de anticuerpos adecuados para la terapéutica en humanos. Los primeros anticuerpos monoclonales que estuvieron disponibles se habían desarrollado en ratones y ratas. Estos anticuerpos 20 al ser utilizados para el tratamiento de humanos provocaban efectos secundarios no deseados debido al desarrollo de anticuerpos anti-roedor. Se han dedicado muchos esfuerzos a la reducción e incluso la eliminación de dichos efectos secundarios no deseados.

En los últimos diez años se ha comercializado un número cada vez mayor de anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpos monoclonales humanizados. Como ejemplos bien conocidos podemos incluir, por ejemplo, Herceptin® y 25 MabThera® de Hoffmann-La Roche, Basilea.

Un número bastante significativo de anticuerpos monoclonales humanos o humanizados se encuentra en investigación y necesita ser estudiado en animales de experimentación, antes de que pueda considerarse su 30 administración en humanos para realizar el primer ensayo.

Con la ayuda de animales de experimentación deben estudiarse criterios importantes como la biodisponibilidad y el aclaramiento de anticuerpos, sólo por mencionar dos de ellos. Muchos de estos estudios requieren la cuantificación del anticuerpo terapéutico en medio de los propios anticuerpos del huésped. En la mayoría de casos se utilizan 35 como animales de experimentación mamíferos. La toxicología se evalúa habitualmente en primer lugar en roedores como ratones y ratas. En etapas más avanzadas del desarrollo del fármaco deben incluirse incluso monos en dichos estudios pre-clínicos, especialmente antes de la administración del fármaco a humanos.

Los mamíferos poseen habitualmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 miligramos de 40 inmunoglobulinas por ml en la circulación.

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos deben analizarse típicamente con niveles séricos entre aproximadamente 1 nanogramo por ml y aproximadamente 100 microgramos por ml. Por lo tanto, el anticuerpo terapéutico debe detectarse en medio de un fondo de anticuerpos del huésped que se encuentra en un exceso de 45 aproximadamente entre 100 veces y 10 millones de veces. La detección de un anticuerpo terapéutico humano o humanizado en medio del fondo de las inmunoglobulinas del huésped representa un cometido bastante significativo del farmacólogo. Además, se apreciará que anticuerpos terapéuticos diferentes pueden necesitar reactivos y formatos de ensayo diferentes. La detección de anticuerpos humanos o humanizados se hace más y más difícil cuanto más cercano se encuentra el animal de experimentación al H. sapiens. 50

En el documento US 2004/214761 se dan a conocer métodos para el tratamiento del mieloma múltiple. Lei, B. y otros en Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41 (2000) 262-266 notifican que los anticuerpos de la retinopatía asociada al melanoma humano alteran la propia respuesta retiniana del mono ERG in vivo. Hazelwood, M. y otros (Clin. Exp. Immunol. 93 (1993) 157-164) notifican la adquisición de anticuerpos contra el polisacárido capsular neumocócico del 55 Haemophilus influenzae tipo b y contra el toxoide tetánico con la edad en el Reino Unido. Nath, D., y otros (J. Biol. Chem. 270 (1995) 26184-26191) notifican que el dominio tipo inmunoglobulina amino terminal de la sialoadhesina contiene el sitio de unión al ácido siálico. En el documento EP 1 098 198 se notifica un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos humanos de la clase IgG.

60 Es un objetivo de la presente invención investigar si pueden mejorarse los métodos para la detección de un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación. También se ha investigado si puede estudiarse un anticuerpo terapéutico humano o humanizado en el suero de monos, especialmente en el suero de simios inferiores. Este objetivo se ha conseguido mediante la presente invención tal como se describe más adelante y en la sección de ejemplos y tal como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. 65

En una primera realización, la presente invención se refiere a un método para detectar un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación que comprende las etapas de a) proporcionar la muestra a analizar, b) incubar dicha muestra con un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y que no se une a las inmunoglobulinas de dicho animal de experimentación, c) opcionalmente incubar dicha muestra con un reactivo adecuado para la detección selectiva del anticuerpo terapéutico total, activo o unido al antígeno y d) correlacionar el complejo formado en (b) o (c) con la concentración de dicho anticuerpo terapéutico.

El término "anticuerpo terapéutico" se refiere a cualquier preparación de anticuerpo destinado a ser utilizado en un ser humano. Preferentemente dicho anticuerpo terapéutico será un anticuerpo monoclonal. Es más preferente que dicho anticuerpo monoclonal se obtenga de un simio superior o sea un anticuerpo monoclonal humano. Preferentemente será un anticuerpo monoclonal humano. También es preferente que dicho anticuerpo monoclonal terapéutico sea un anticuerpo monoclonal humanizado.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales que forman parte de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, en comparación con las preparaciones de anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epitopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de por su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden ser sintetizados sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo a ser obtenido a partir de una población substancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción de los anticuerpos por cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse mediante el método del hibridoma, descrito por primera vez por Koehler, G., y otros, *Nature* 256 (1975) 495-497, o mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente U.S. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson, T., y otros, *Nature* 352 (1991) 624-628 y Marks, J. D., y otros, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias parciales derivadas de inmunoglobulinas no humanas y de inmunoglobulinas humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados derivan de una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor), en la cual se sustituyen residuos de la región hipervariable del receptor por residuos de una región hipervariable de especies no humanas (anticuerpo donante) tales como el ratón, la rata, el conejo o primates no humanos que poseen la afinidad y especificidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender modificaciones adicionales, por ejemplo, residuos de aminoácidos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Dichas modificaciones dan lugar a variantes de dicho anticuerpo receptor o donante que son homólogas pero no idénticas a la secuencia original correspondiente. Estas modificaciones se realizan para mejorar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o substancialmente todas las asas hipervariables corresponden a las de un anticuerpo donante no humano y todas o substancialmente todas las FR son de un anticuerpo receptor humano. Los anticuerpos humanizados también comprenderán opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana.

En la técnica se han descrito métodos para la humanización de anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado posee uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan habitualmente residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones, P.T., y otros, *Nature* 321 (1986) 522-525; Riechmann, L., y otros, *Nature*, 332 (1988) 323-327; Verhoeyen, M., y otros, *Science*, 239 (1988) 1534-1536 y Presta, L.G., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2 (1992) 593-596), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo no humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente U.S. nº 4.816.567), en los que substancialmente menos de un dominio variable humano ha sido sustituido por los dominios correspondientes de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de la FR se han sustituido por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La selección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a ser utilizados en la síntesis de anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método del "mejor ajuste", se criba la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humana conocidas. A continuación se acepta como región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado la secuencia humana más cercana a la del roedor (Sims, M.J., y otros, J.

Immunol., 151 (1993) 2296-2308; Chothia, C., y otros, J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917). Otro método utiliza una region marco concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Dicho marco puede ser utilizado para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter, P., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 4285-4289; Presta, L.G., y otros, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632).

Son ejemplos bien conocidos de anticuerpos terapéuticos humanizados los denominados anticuerpos anti-ErbB2 incluyendo huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) tal como se describe en la tabla 3 de la patente U.S. 5.821.337; así como el anticuerpo 520C9 humanizado (descrito en WO 93/21319) y el anticuerpo humanizado 2C4 tal como se describe en WO 2004/008099.

El término "variante" hace referencia a polipéptidos que poseen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de la secuencia de polipéptido original. Normalmente, una secuencia de aminoácidos variante poseerá una homología de al menos aproximadamente el 80% con la secuencia del anticuerpo original correspondiente, y preferentemente, tendrán una homología de al menos aproximadamente el 90%, más preferentemente de al menos aproximadamente el 95% con dicha secuencia de anticuerpo original correspondiente. Las secuencias de aminoácidos variantes poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en posiciones determinadas dentro de la secuencia de aminoácidos original.

"Homología" se define como el porcentaje de residuos de la secuencia de aminoácidos variante que son idénticos tras alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología. Son bien conocidos en la técnica métodos y programas informáticos para la alineación. Uno de dichos programas informáticos es "Align 2", cuyo autor es Genentech, Inc., presentado con la documentación para el usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

El término "animal de experimentación" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a miembros de las familias del orden de los primates, comprendiendo títies y tamarinos (familia Callitrichidae), monos del nuevo mundo (familia Cebidae), monos del viejo mundo (familia Cercopithecidae), lémures enanos y ratón (familia Cheirogaleidae), aye-aye (familia Daubentoniidae), gálagos (familia Galagonidae), gibones y simios inferiores (familia Hylobatidae), indris, sifacas y familiares (familia Indridae), lémures verdaderos (familia Lemuridae), loris (familia Loridae), lepilemúridos (familia Megaladapidae), tarsios (familia Tarsiidae), así como cruces de los mismos.

Preferentemente, el método según la presente invención se llevará a cabo en animales de experimentación seleccionados del grupo formado por los miembros de las familias de los títies y tamarinos, monos del viejo mundo, lémures enanos y ratón, gibones y simios inferiores, lémures verdaderos, así como cruces de los mismos. En esta realización preferente se excluyen las especies más cercanas a la raza humana, los simios mayores, especialmente los chimpancés, bonobos, gorilas y orangutanes.

Una "muestra" según la presente invención puede ser cualquier muestra de tejido o líquido extraída del animal de experimentación. Preferentemente, la muestra será una muestra líquida como la saliva, la orina, la sangre total, el plasma o el suero. Preferentemente la muestra será sangre total, plasma o suero.

Un "anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas de un animal de experimentación" se unirá a un anticuerpo terapéutico con una constante de disociación (=KDiss.) de, como mínimo, 10^{-9} mol/L, más preferente con una KDiss. de al menos 10^{-10} mol/L. Al mismo tiempo la propiedad de no unión a las inmunoglobulinas del animal de experimentación se garantiza con una KDiss. de 10^{-8} mol/L o peor. También de forma preferente, el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación poseerá una separación de KDiss. entre la reactividad frente a la IgG de un animal de experimentación y la reactividad frente a la IgG humana de al menos 100 veces, respectivamente.

Las propiedades de unión de un anticuerpo, especialmente la KDiss. se evalúa preferentemente mediante un instrumento Biacore®. En este método se evalúan las propiedades de unión mediante los cambios en la resonancia de plasmones superficiales (SPR). Es conveniente unir el anticuerpo investigado a la fase sólida (denominada chip) y evaluar la unión de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o incluso un suero que comprende IgG a este chip recubierto.

El anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación investigado puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como constructos genéticos que comprendan el dominio de unión de dicho anticuerpo. Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que retenga los anteriores criterios de unión al anticuerpo terapéutico y no unión a la inmunoglobulina de dicho animal de experimentación. Los anticuerpos, así como los fragmentos de anticuerpos, se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays ("Teoría y práctica de los inmunoensayos enzimáticos") 11 (1990), todo el libro, especialmente las páginas 43-78, Elsevier, Amsterdam).

Tal como se ha mencionado previamente, pueden tener que evaluarse diversos aspectos relacionados con la aplicación de un anticuerpo terapéutico en un animal de experimentación durante estudios pre-clínicos. En algunas situaciones puede ser relevante analizar la cantidad total de anticuerpo terapéutico presente, o puede ser importante analizar algunos fragmentos de un anticuerpo terapéutico, ciertas modificaciones del mismo, la concentración de anticuerpo terapéutico unida a un antígeno o la fracción de anticuerpo terapéutico aún capaz de unirse a un antígeno. Preferentemente, el método según la presente invención se utiliza para detectar respectivamente el anticuerpo terapéutico total, activo o unido al antígeno.

El término anticuerpo terapéutico "total" se refiere a un anticuerpo detectado independientemente de si el anticuerpo es activo (es decir, todavía puede reaccionar con su antígeno), inactivo y/o unido al antígeno.

El término anticuerpo terapéutico "activo" se refiere al anticuerpo terapéutico presente en un animal de experimentación que aún es capaz de unirse a su antígeno. Dichos anticuerpos, por ejemplo, no tienen unido su antígeno o cualquier otra molécula en su lugar de unión.

El término anticuerpo terapéutico "unido al antígeno" se utiliza para indicar que el anticuerpo terapéutico, tal como se halla presente en la circulación de un animal de experimentación, está unido a su antígeno.

Mediante el método según la presente invención pueden detectarse directamente el anticuerpo total, activo o unido al antígeno tal como se han definido anteriormente.

Además, también es posible evaluar indirectamente cualquier anticuerpo terapéutico "inactivo". Dicho anticuerpo terapéutico inactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico unido a su antígeno, el anticuerpo terapéutico unido a un antígeno con reactividad cruzada, o el anticuerpo terapéutico bloqueado por un autoanticuerpo contra dicho anticuerpo terapéutico. Como apreciarán los expertos en la técnica, es posible con la ayuda de la presente publicación evaluar la fracción de anticuerpo inactivo. En caso de que el anticuerpo total sea superior a la suma del anticuerpo activo y anticuerpo unido al antígeno, se hallará presente una fracción adicional de anticuerpo formada por el anticuerpo inactivo no unida a su antígeno correspondiente.

Se dispone de diversos sistemas de ensayo para analizar, por ejemplo, el anticuerpo total o unido al antígeno.

El anticuerpo total puede detectarse, por ejemplo, en el denominado sistema de inmunoensayo competitivo o en el denominado sistema de ensayo tipo sándwich.

Dicho ensayo puede realizarse sin etapas de lavado (inmunoensayo homogéneo) o con etapas de lavado (inmunoensayo heterogéneo).

Preferentemente, el anticuerpo terapéutico total se detecta en un inmunoensayo tipo sándwich, en el que el anticuerpo que se une al anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación se utiliza a ambos lados del sándwich. El anticuerpo utilizado a un lado del sándwich se une o es capaz de unirse a una fase sólida (denominada habitualmente como anticuerpo de captura), mientras que el otro lado de dicho sándwich se marca de manera que se facilita la detección directa o indirecta (denominando anticuerpo de detección). La cantidad de anticuerpo de detección unido en un procedimiento de ensayo sándwich de este tipo se correlaciona directamente con la cantidad de anticuerpo terapéutico en la muestra investigada.

En la técnica se conocen sistemas de ensayo (por ejemplo, US 2003/0068664), que permiten la detección de anticuerpos terapéuticos activos. Dichos sistemas requieren la unión del antígeno a una fase sólida, la unión del anticuerpo terapéutico a dicho antígeno unido y la detección del anticuerpo terapéutico unido a la fase sólida a través del antígeno.

Puede conseguirse la detección en una muestra del anticuerpo terapéutico activo mediante procedimientos adecuados del estado de la técnica. Sin embargo, la detección del anticuerpo terapéutico total o de la fracción de anticuerpo terapéutico unido a su antígeno es bastante complicada y requiere configuraciones de ensayo bastante diferentes y requiere especialmente reactivos hechos a medida para cada uno de los diferentes ensayos. Con el anticuerpo según la presente invención que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación es posible evaluar la fracción de anticuerpo terapéutico activo, el anticuerpo terapéutico total o el anticuerpo terapéutico unido al antígeno en sistemas de ensayo que son análogos entre sí. Por su propia naturaleza, este tipo de evaluación comparativa del anticuerpo terapéutico total, activo o unido al antígeno debería poseer grandes ventajas cuando se realizan comparaciones cuantitativas entre estas fracciones diferentes de anticuerpo terapéutico.

Preferentemente, se configura (también) un ensayo tipo sándwich para detectar el anticuerpo terapéutico activo. Preferentemente, se utiliza el anticuerpo que se une al anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación como anticuerpo de captura y el lado de detección de dicho ensayo tipo sándwich o bien utiliza el antígeno en una forma marcada o bien tras la unión del antígeno utiliza un segundo anticuerpo que no se

une o compite con el epítipo reconocido por el anticuerpo terapéutico, donde dicho segundo anticuerpo es detectable específicamente y/o está marcado de manera que facilita la detección directa o indirecta.

5 El anticuerpo terapéutico unido al antígeno se detecta preferentemente en un formato de ensayo tipo sándwich, utilizando preferentemente de nuevo el anticuerpo que se une al anticuerpo terapéutico y que no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación como reactivo de captura. En la detección se utiliza preferentemente un anticuerpo secundario que se une al antígeno en un epítipo que no compite con el epítipo del anticuerpo terapéutico. Dicho anticuerpo secundario está preferentemente marcado de manera que se facilita la detección directa o indirecta.

10 Para la detección directa el grupo marcador puede seleccionarse entre cualquiera de los grupos marcadores detectables conocidos, tales como colorantes, grupos de marcaje luminiscente tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o colorantes fluorescentes, por ejemplo fluoresceína, cumarina, rodamina, oxacina, resorufina, cianina o derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos marcadores son los complejos metálicos luminiscentes, tales como los complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo tal como se utilizan para el ELISA o el CEDIA (Inmunoensayo con Enzimas Clonadas de Donador, por ejemplo EP-A-0 061 888), y radiosiótopos.

15 Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo el anticuerpo de detección, se marca con un primer componente de un par de unión bioafín. Son ejemplos de pares de unión adecuados hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina, o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogos de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo receptor de hormonas esteroideas/hormona esteroidea. Son preferentes como primer miembro del par de unión hapteno, antígeno y hormona. Son especialmente preferentes los haptenos como la digoxina y la biotina y análogos de los mismos. El segundo componente de dicho par de unión, por ejemplo un anticuerpo, estreptavidina, etc., habitualmente se marca para permitir la detección directa, por ejemplo, con los marcadores previamente mencionados.

20 Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la técnica. En los libros de texto relacionados se resumen los métodos para realizar dichos ensayos, así como procedimientos y aplicaciones prácticas. Son ejemplos de libros de texto relacionados Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates ("Preparación de conjugados enzima-anticuerpo y otros conjugados enzima-macromolécula") (en: "Practice and theory of enzyme immunoassays" ("Práctica y teoría de los inmunoensayos enzimáticos") (1990), pp. 221-278, Eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Ámsterdam) y varios volúmenes de "Methods in Enzymology" ("Métodos de enzimología") (Eds. S.P. Colowick, N.O. Caplan, Academic Press), que versan sobre métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

25 En todos los métodos de detección inmunológica anteriores se selecciona condiciones de los reactivos que permiten la unión de los reactivos utilizados, por ejemplo la unión de un anticuerpo a su antígeno correspondiente. Los expertos en la técnica se refieren al resultado de este acto de unión utilizando el término complejo. El complejo formado en un método de ensayo según la presente invención se correlaciona mediante procedimientos del estado de la técnica con la concentración correspondiente de dicho anticuerpo terapéutico. Dependiendo del reactivo de detección empleado, esta etapa de correlación dará lugar a la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido al antígeno.

30 Como apreciarán los expertos en la técnica, los métodos según la presente invención no sólo revelarán las concentraciones de anticuerpo terapéutico total, unido al antígeno, activo o incluso inactivo. Debido a la utilización preferente de un sólo reactivo idéntico, el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas de dicho animal de experimentación, en los diferentes ensayos, los valores obtenidos pueden ser fácilmente comparados entre sí pudiendo incluso evaluarse cocientes entre los mismos. Este cociente también puede ser utilizado como indicador de la eficacia de un anticuerpo terapéutico.

35 Durante el curso de los experimentos que condujeron a la presente invención se ha observado que un determinado epítipo que se halla presente en todas las clases de inmunoglobulinas humanas de la clase G parece no estar presente en las inmunoglobulinas de todos los animales de experimentación excepto en la IgG de los chimpancés. Este epítipo se caracteriza por su unión a MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9, también denominado MAB<h-Fc γ gamma>M-R10Z8E9, o de forma más breve MAB M-R10Z8E9. En una realización preferente, según la presente invención, el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y que no se une a las inmunoglobulinas de un animal de experimentación se caracteriza además porque dicho anticuerpo es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que MAB M-R10Z8E9. MAB M-R10Z8E9 ha sido depositada en la DSMZ el 22 de diciembre de 2004 como DSM ACC2708.

40 Preferentemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a un anticuerpo terapéutico, poseyendo este anticuerpo monoclonal un lugar de combinación con el antígeno que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal MAB M-R10Z8E9 tal como es producido por el híbrido depositado con la DSMZ. El término "inhibe competitivamente" significa que es capaz de reconocer y unirse al

epítopo tal como lo reconoce el anticuerpo monoclonal M-R10Z8E9. Dicha unión es fácilmente evaluable utilizando ensayos de competición recíproca de anticuerpos convencionales.

5 Brevemente, en un experimento de competición recíproca se investiga si dos (o más) agentes de unión específica inhiben la unión el uno del otro al mismo antígeno o epítopo. Supongamos que se investiga la unión de los anticuerpos A y B al mismo epítopo. Ambos anticuerpos competirán por la unión si se unen al mismo epítopo. La unión al mismo epítopo estará presente si el anticuerpo A, a una concentración equimolar, disminuye la unión de B al menos un 20% y viceversa.

10 Como apreciarán los expertos en la técnica, la competición puede evaluarse con diferentes configuraciones de ensayo.

15 Preferentemente se utiliza, ver más arriba, el sistema Biacore®. Existirá unión del anticuerpo investigado al mismo epítopo al que se une MAB M-R10Z8E9 si el anticuerpo investigado a una concentración equimolar disminuye la unión de MAB M-R10Z8E9 a la IgG humana un 20% o más y si MAB M-R10Z8E9 disminuye la unión de dicho anticuerpo a la IgG humana un 20% o más.

20 En aún otra realización preferente se utiliza, en un método según la presente invención, MAB M-R10Z8E9 como el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación.

25 Tal como se ha mencionado previamente, el anticuerpo terapéutico detectado en un método según la presente invención es preferentemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. Preferentemente el anticuerpo terapéutico utilizado en un método según la presente invención comprende el epítopo al que se une MAB M-R10Z8E9.

30 En una realización preferente adicional la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas de un animal de experimentación para determinar la concentración de anticuerpo total, activo o unido al antígeno en una muestra obtenida de un animal de experimentación. Preferentemente el anticuerpo utilizado en dicho método es un anticuerpo que se une al epítopo reconocido por MAB M-R10Z8E9.

35 Los ejemplos, referencias y figuras siguientes se aportan para contribuir a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se establece en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

40 **Figura 1. Detección del anticuerpo terapéutico total.** El anticuerpo monoclonal biotilado (MAB<H-Fcγ pan>-M-R10Z8E9-Bi) se une a una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina (SA-MTP). El anticuerpo terapéutico MAB<IGF-1R> se une y se detecta indirectamente a través de MAB<H-Fcγ pan> M-R10Z8E9-DIG marcado con digoxigenina y un conjugado anti-digoxigenina peroxidasa de rábano picante (PAB<DIG>HRP).

45 **Figura 2: Detección del anticuerpo terapéutico total diluido en tampón.** Se muestran las densidades ópticas (OD) para diversas concentraciones del anticuerpo terapéutico diluido en PBS-T, BSA 0,5% (peso/volumen).

50 **Figura 3: Detección del anticuerpo terapéutico total diluido en tampón pero conteniendo también un 5% (volumen/volumen) de suero de *Macaca fascicularis*.** Se muestran las densidades ópticas (OD) para diversas concentraciones del anticuerpo terapéutico diluido en PBS-T, BSA 0,5% con un 5% (volumen/volumen) de suero de *Macaca fascicularis*.

55 **Figura 4: Detección del anticuerpo terapéutico activo a través de un antígeno en fase sólida.** Esta figura muestra los reactivos utilizados en la detección del anticuerpo terapéutico activo a través de un antígeno unido a una fase sólida. En el ejemplo concreto mostrado, el receptor soluble de la interleuquina 1 biotilado (s-IL-1R-Bi) está unido a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina (SA-MTP). El anticuerpo terapéutico activo se une al antígeno y se detecta de forma indirecta a través del anticuerpo anti-humano digoxigenilado (MAB<H-Fcγ pan>M-R10Z8E9-DIG) y anti-DIG-HRP (PAB<DIG>HRP).

60 **Figura 5: Detección del anticuerpo terapéutico activo diluido en tampón.** Se muestran las densidades ópticas (OD) para diversas concentraciones del anticuerpo terapéutico diluido en PBS-T, BSA 0,5%.

Figura 6: Detección del anticuerpo terapéutico activo diluido en tampón comprendiendo además un 5% de suero de *Macaca fascicularis*. Se muestran las densidades ópticas (OD) para diversas concentraciones del anticuerpo terapéutico diluido en PBS-T, BSA 0,5% con un 5% de suero de *Macaca fascicularis*.

Figura 7: Detección del anticuerpo terapéutico activo en un formato de ensayo tipo sándwich. El anticuerpo monoclonal biotilado (MAB<H-Fcy pan>-M-R10Z8E9-Bi) está unido a una placa de microtitulación revestida de estreptavidina (SA-MTP). La detección es indirecta utilizando el antígeno marcado con digoxigenina (s-IL-1R-DIG) y un conjugado anti-digoxigenina peroxidasa de rábano picante (PAB<DIG>HRP).

5 **Figura 8: Detección del anticuerpo terapéutico activo diluido en tampón mediante un ensayo tipo sándwich.** Se muestran las densidades ópticas (OD) para diversas concentraciones del anticuerpo terapéutico diluido en PBS-T, BSA 0,5%.

10 **Figura 9: Detección del anticuerpo terapéutico activo diluido en tampón comprendiendo además un 5% de suero de *Macaca fascicularis* mediante un ensayo tipo sándwich.** Se muestran las densidades ópticas (OD) para diversas concentraciones del anticuerpo terapéutico diluido en PBS-T, BSA 0,5% con un 5% de suero de *Macaca fascicularis*.

15 Abreviaturas

ABTS	Sal diamónica de 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato (6)].
BSA	Albúmina sérica bovina.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
20 Fcy	=Fcy = Fcg = Fcgamma = Fragmento Fc gamma de una inmunoglobulina.
POD (=HRP)	Peroxidasa de rábano picante.
IgG	Inmunoglobulina G.
DIG (Dig)	Digoxigenina
MPT	Placa de microtitulación
25 OD	Densidad óptica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
SDS	Dodecilsulfato sódico
MAK (=Mab)	Anticuerpo monoclonal
PAK (=Pab)	Anticuerpo policlonal
30 RT	Temperatura ambiente
SA	Estreptavidina
T	Tween®20
<IgG humana>	anticuerpo contra la IgG humana

35 Ejemplo 1

Evaluación de la especificidad

a) Utilización de varios anticuerpos anti-IgG humana en un MTP-ELISA

40 Se revistieron placas de microtitulación (MTP) (Maxisorb®, Nunc) respectivamente con suero de mono (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y con suero humano a una dilución del 20% en tampón carbonato (pH 9,6) a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora, respectivamente. Tras lavar 3 veces con PBS-Tween®20, se bloquearon todos los pocillos de las MTP con PBS/BSA 3% a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se incubaron (1h, RT)

45 los pocillos de las MTP con anticuerpos anti-IgG humana diferentes (no conjugado, o conjugados de anticuerpo anti-IgG humana con peroxidasa de rábano picante (POD) (ver tabla 1)). Los diferentes anticuerpos anti-humanos se utilizaron según lo recomendado por el fabricante correspondiente.

50 Se lavaron los pocillos tres veces como se ha descrito previamente. Los pocillos incubados con conjugados-POD se procesaron directamente para proceder a la reacción enzimática/detección de la inmunoglobulina anti-humana unida. Los otros pocillos se incubaron (1 h.; RT) según procediera con anti-Dig, anti-IgG de ratón o conjugados estreptavidina-POD (todos los reactivos de Roche Diagnostics, Alemania) seguido de una etapa de lavado. El POD comprendido en los conjugados-POD cataliza la reacción de color del sustrato ABTS. La señal se determinó por un lector ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Se calculó el cociente de

55 la señal frente los anticuerpos humanos respecto a la señal del suero de *Macaca fascicularis* para todos los anticuerpos anti-IgG humana. Estos valores se utilizaron para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-IgG humana. Un cociente elevado indica una reactividad fuerte con la inmunoglobulina humana y al mismo tiempo una reactividad (reactividad cruzada) baja con la inmunoglobulina de mono.

Tabla 1:

Reactividad de anticuerpos anti-humano con suero humano y de mono <i>Macaca fascicularis</i>			
Anticuerpo	Señal en 10% (volumen/volumen) de suero humano	Señal en 10% (volumen/volumen) de suero de <i>Macaca fascicularis</i>	Cociente de la señal Humano/ <i>Macaca fascicularis</i>
MAK<IgG humana> MK1A6 // Chemicon # CBL101 (*)	0,743	0,895	0,83
PAK<IgG humana>-Bi // Dako # E0428 (**)	2,066	1,815	1,14
MAK<H-Fc γ pan> MR10Z8E9- Dig (***)	1,847	0,032	58,63
MAK<H-Fc γ pan> MR10Z8E9(*)	1,779	0,199	8,96
MAK<Agg-IgG humana> IgM-Dig (***)	1,541	0,700	2,20
MAK<Kappa humana>R12Z6H9- Dig (***)	1,566	0,720	2,17
MAK<Hu-IgG> F(ab') ₂ -HRP // Dianova #109-066-098	1,401	0,953	1,47
MAK<IgG humana> HRP // Chemicon # AP 113P	0,973	0,574	1,70
PAK<IgG humana> F(ab) ₂ -HRP // Dako # P0406	0,513	0,431	1,19
MAK<IgG Humana>-HRP // Boehringer Mannheim (alt)	1,383	0,796	1,74
Controles :			
<ratón>-HRP	0,139	0,131	1,07
<Dig>-HRP	0,029	0,031	0,94
SA-HRP	0,193	0,288	0,67
(*) = Detección con <ratón>-HRP (**) = Detección con SA-HRP (***) = Detección con <Dig>-HRP			

5 El elevado cociente de señal para el suero humano en comparación con el suero de *Macaca fascicularis* observado en el caso del MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 indica la elevada especificidad humana del MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9. Al contrario que en el caso de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 el resto de anticuerpos analizados muestran una reactividad cruzada elevada.

10 En base a los esperanzadores datos anteriores, se investigó la reactividad cruzada de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 frente las inmunoglobulinas de otros animales de experimentación relevantes.

Se revistieron los pocillos de una placa de microtitulación con suero de diversos animales de experimentación. El ensayo se realizó tal como se ha descrito anteriormente, utilizando el MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 como reactivo de detección específico de anti-IgG humana.

15 Como puede observarse en la Tabla 2 MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 reacciona exclusivamente con la inmunoglobulina de suero humano, IgG humana o suero de chimpancé respectivamente.

20 La reactividad de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 con los sueros de ratón, rata, perro, mono y humano se muestran en las tablas 2^a y 2b, respectivamente.

Tabla 2a:

Detección con MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9-Dig // <Dig>-POD		
Suero (10% (volumen/volumen))	Señal	Cociente entre señal humano / animal
Perro	0,096	19,24
Rata	0,034	54,32
Ratón-CD1	0,028	65,96
Ratón-NMRI	0,065	28,42
<i>Macaca fascicularis</i>	0,032	58,63
Babuino	0,029	63,69
Macaco Rhesus	0,031	60,56
Tití	0,128	14,43
Chimpancé	1,865	0,99
Humano	1,847	1,00
IgG humana (5 μ g/ml)	1,821	1,01

Tabla 2b:

Detección con conjugados anti-IgG de ratón POD		
Suero (10% (volumen/volumen))	Señal	Cociente entre señal humano / animal
<i>Macaca fascicularis</i>	0,199	8,96
Babuino	0,131	13,63
Macaco Rhesus	0,186	9,59
Tití	0,239	7,46
Chimpancé	1,893	0,94
Humano	1,779	1,00
IgG humana (5 μ g/ml)	2,105	0,85

5 Es interesante resaltar que en los sistemas de detección indirecta anteriores la calidad del reactivo final <DIG>-POD o <ratón>-POD utilizados en la detección indirecta también tienen influencia sobre el cociente entre señal y el ruido de fondo. El técnico experto seleccionará un reactivo de detección sin unión o con una unión mínima a la IgG del animal de experimentación.

10 b) Evaluación de la unión/especificidad del anticuerpo mediante el sistema Biacore®

15 Todas las determinaciones se realizaron con el instrumento Biacore® 2000 utilizando un chip CM5. El revestimiento de este chip con el anticuerpo se consiguió mediante acoplamiento de aminas estándar. Si no se indica lo contrario, todas las incubaciones se realizaron en tampón HPS (HEPES, NaCl, pH 7,4) a 25°C.

20 Se inmovilizaron, respectivamente, cantidades saturantes de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 y de anticuerpo policlonal anti-Fc γ humana (Dianova), mediante el acoplamiento de aminas sobre diferentes canales del mismo chip CM5. Todos los sueros de animales se diluyeron en tampón HBS con 1 mg/ml de CM-dextrano a una concentración final del 1%. La unión se analizó mediante inyección de los sueros diluidos 1 en 100 e incubación durante 60 segundos. La disociación se determinó mediante el lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 180 segundos. Se calcularon los valores de la constante de disociación (=KDiss) utilizando el software Biaevaluation Software de Biacore® con un modelo de ajuste Langmuir 1:1. Para todos los sueros de animal este cálculo se basó en el supuesto de que el nivel de IgG era de 15 mg/ml. Para comparar la cantidad de IgG unida (RU en las tablas 2c y 2d) se han seleccionado los valores de la señal 80 segundos después del inicio de la inyección del anticuerpo de ensayo.

Tabla 2c:

Señales de unión [RU] de sueros de animal a MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 y a antisuero policlonal anti-Fc γ humana				
Muestra (suero)	MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9		PAB<H-Fc γ >(Dianova)	
	RU unido	KD en M	RU unido	KD en M
Humano	2377	$1,83 \times 10^{-10}$	2399	$5,64 \times 10^{-10}$
<i>Macaca Fascicularis</i>	8	no unión	1929	$6,24 \times 10^{-11}$
Ratón CD1	2	no unión	0	no unión
Ratón NMRI	5	no unión	3	no unión
Rata	25	no unión	92	$5,28 \times 10^{-8}$
Perro	634	$8,12 \times 10^{-8}$	925	$6,21 \times 10^{-10}$

Tabla 2d:

Señales de unión [RU] de diferentes sueros de mono a MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 y a antisuero policlonal anti-Fc γ humana				
Muestra (suero)	MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9		PAB<H-Fc γ >(Dianova)	
	RU unido	KDiss en M	RU unido	KDiss en M
Humano	1274,0	$1,77 \times 10^{-10}$	1854,2	$2,81 \times 10^{-11}$
<i>Macaca fascicularis</i> 1	2,9	no unión	1591,9	$6,64 \times 10^{-11}$
<i>Macaca fascicularis</i> 2	2,8	no unión	1413,1	$5,21 \times 10^{-11}$
<i>Macaca fascicularis</i> 3	6,3	no unión	1899,0	$1,15 \times 10^{-10}$
Babuino	0	no unión	1209,8	$7,33 \times 10^{-11}$
Tití	5,1	no unión	433,9	$1,02 \times 10^{-9}$
Chimpancé	1077,5	$2,21 \times 10^{-10}$	1967,5	$1,21 \times 10^{-12}$
Macaco Rhesus	-2,9	no unión	1409,9	$4,86 \times 10^{-11}$

El análisis SPR (de los diferentes sueros de mono) confirma los resultados observados en el MTP ELISA. MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 carece de reacción cruzada con ninguna de las especies de mono. Solamente se detecta la IgG contenida en el suero humano y de chimpancé (simio superior). Al contrario de con el MTP ELISA, existe cierta unión del suero de perro a MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9. La KDiss relativamente elevada, para la IgG de perro (que se correlaciona con una menor unión) en comparación con la IgG humana con una diferencia de KDiss de más de 100 veces indica, que esta baja interacción no interfiere significativamente en un inmunoensayo. Esto es lo que de hecho se ha observado en el MTP ELISA del ejemplo 1a).

En comparación con MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 el anticuerpo policlonal anti-Fc humana muestra una elevada reactividad cruzada con el suero de perro y todas las especies de mono analizadas.

Ejemplo 2

Utilización de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 para cuantificar el anticuerpo terapéutico total.

En la primera etapa se unió MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 o anticuerpo policlonal dirigido contra la Fc humana a placas de microtitulación revestidas con estreptavidina (SA-MTP). El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Las muestras/estándares, por ejemplo MAB <IGF-1R> añadidos a suero de *Macaca fascicularis*, se preincubaron con MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 digoxigenilada (-DIG) durante 1 hora. Tras ello se añadió la mezcla a los pocillos de una SA-MTP revestidos con anticuerpos <IgG humana> biotinilados y se incubó durante 1 hora. Tras lavar se detectó la MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 digoxigenilada unida con un anticuerpo anti-digoxigenina. La POD del conjugado anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS. La señal se mide con el lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

Tabla 3:

Comparación de las curvas estándar en tampón (PBS-T, BSA 0,5%)		
Concentración de MAB <IGF-1R> [ng/ml]	Señal OD 405 nm	
	*MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9	PAB<H-Fc γ > (Dianova)
10	2,039	1,937
5	1,109	1,094
2,5	0,586	0,593
1,25	0,296	0,326
0,625	0,170	0,176
0,313	0,108	0,106
0,156	0,075	0,068
0	0,046	0,027

Como puede observarse en la tabla 3 y la figura 2 ambos anticuerpos anti-Fc-gamma humana son adecuados para la cuantificación de los anticuerpos humanos (MAG <IGF-1R>), si se añaden al tampón. Sin embargo, en presencia de IgG de mono (5% de suero de *Macaca fascicularis*) el rendimiento del ELISA con el AB<H-Fc γ > se vuelve significativamente peor. (tabla 4 y figura 3).

Tabla 4:

Comparación de las curvas estándar en 5% de suero de <i>Macaca fascicularis</i>		
Concentración de MAB <IL-1R> [ng/ml]	Señal OD 405 nm	
	*MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9	PAB<H-Fc γ > (Dianova)
10	1,990	1,5230
5	1,057	1,4335
2,5	0,559	1,4410
1,25	0,289	1,3840
0,625	0,166	1,3610
0,313	0,108	1,3780
0,156	0,091	1,3170
0	0,054	1,3870

Debido a la reactividad cruzada de PAB<H-Fc γ > (Dianova) con la IgG de mono no es posible una cuantificación verdadera o correcta de la IgG humana en suero de mono.

5

Ejemplo 3

Utilización de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 en la cuantificación del anticuerpo humano MAB<IL-1R> activo

- 10 En la primera etapa se unió receptor soluble de IL-1 humano (h-IL-1R-Bi) a placas de microtitulación revestidas de estreptavidina (SA-MTP). El exceso de receptor no unido se eliminó mediante lavado. Tras ello MAB<IL-1R> añadido a suero de *Macaca fascicularis* se unió al receptor humano de IL-1. Tras eliminar por lavado las sustancias no unidas se detectó el MAB <IL-1R> unido con a) anticuerpo monoclonal digoxigenilado contra las cadenas IgG humanas (MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9-DIG) seguido de incubación con anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante; o con b) anticuerpos anti-Fc humana policlonales (Dianova) seguido de una etapa de lavado. La POD contenida en el conjugado anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS. La señal se mide con el lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

20

Tabla 5:

Detección de anticuerpo terapéutico total		
Concentración de MAB <IL-1R> [ng/ml]	Señal OD 405 nm	
	*MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9	PAB<H-Fc γ > (Dianova)
10	1,921	1,682
5	1,307	0,933
2,5	0,770	0,489
1,25	0,424	0,262
0,625	0,231	0,143
0,313	0,125	0,084
0,156	0,074	0,057
0	0,020	0,031

Tabla 6:

Detección de anticuerpo terapéutico total en suero de <i>Macaca fascicularis</i>		
Concentración de MAB <IL-1R> [ng/ml]	Señal OD 405 nm	
	*MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9	PAB<H-Fc γ > (Dianova)
10	1,642	1,789
5	1,637	1,608
2,5	1,272	1,400
1,25	0,755	1,228
0,625	0,435	1,419
0,313	0,236	1,331
0,156	0,128	1,315
0	0,027	1,332

- 25 Los datos mostrados en las tablas 5 y 6 y las figuras 5 y 6 demuestran que ambos anticuerpos anti-Fc-gamma humana son adecuados para la cuantificación de anticuerpos humanos activos (MAB<IL-1R>) añadidos a tampón. Sin embargo en presencia de IgG de mono (5% (volumen/volumen) de suero de *Macaca fascicularis*) el rendimiento del ELISA con el anticuerpo policlonal AB<H-Fc γ > se vuelve significativamente peor. Debido a la reactividad cruzada con la IgG de mono la sensibilidad disminuye y la variabilidad aumenta.

Ejemplo 4

Utilización de MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 en la cuantificación de MAB <IL-1R> en suero de mono

- 5 En la primera etapa se unió MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9 biotinilado o anticuerpo anti-IgG humana policlonal biotinilado dirigido contra Fc (b) en pocillos de placas de microtitulación revestidos de estreptavidina (SA-MTP). El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Tras ello se unió el MAB <IL-1R> añadido a suero de *Macaca fascicularis* al anticuerpo anti-humano inmovilizado. Tras eliminar por lavado las sustancias no unidas se detectó el MAB <IL-1R> con receptor soluble IL-1 humano digoxigenilado (h-IL-1R-Dig) seguido de incubación con
- 10 un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del substrato ABTS. La señal se mide con el lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.
- 15 En la figura 7 se muestra un esquema que ejemplifica este sistema de análisis.

Tabla 7:

Comparación de las curvas estándar en tampón (PBS-T, BSA 0,5%)		
Concentración de MAB <IL-1R> [ng/ml]	Señal OD 405 nm	
	*MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9	PAB<H-Fc γ > (Dianova)
5	1,824	1,685
2,5	1,319	1,112
1,25	0,837	0,702
0,625	0,497	0,413
0,313	0,277	0,229
0,156	0,159	0,132
0	0,025	0,032

Tabla 8:

Comparación de las curvas estándar en 5% de suero de <i>Macaca fascicularis</i>		
Concentración de MAB <IL-1R> [ng/ml]	Señal OD 405 nm	
	*MAB<H-Fc γ pan>M-R10Z8E9	PAB<H-Fc γ > (Dianova)
5	1,635	0,805
2,5	1,179	0,460
1,25	0,707	0,278
0,625	0,421	0,163
0,313	0,231	0,101
0,156	0,136	0,070
0	0,026	0,04

- 20 Si el anticuerpo terapéutico se diluye en PBS-T con BSA al 5% ambos anticuerpos anti-humano funcionan (ver tabla 7 y figura 8). Sin embargo, en presencia de IgG de mono (5% de suero de *Macaca fascicularis*) el rendimiento del ELISA utilizando el anticuerpo policlonal AB<H-Fc γ > es pobre. La salida de señal es mucho más baja a pesar de estar presente la misma cantidad de anticuerpo terapéutico, tal como se muestra en la tabla 8 y figura 9. Debido a la reactividad cruzada con la IgG de mono, el rendimiento del ensayo depende de la cantidad total y composición de la IgG de mono, que puede variar de animal a animal y de punto temporal a punto temporal.

Lista de referencias

- 30 Carter, P., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 4285-4289
 Chothia, C., y otros, J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917
 Clackson, T., y otros, Nature 352 (1991) 624-628
 Colowick, S. P., Caplan, N.O. (eds.), Methods in Enzymology, Academic Press
 35 Computer program "Align 2" por Genentech, Inc., United States Copyright Office, Washington, DC 20559, December 10, 1991
 EP-A 0 061 888
 Jones, P.T., y otros, Nature 321 (1986) 522-525
 Koehler, G., y otros, Nature 256 (1975) 495-497
 40 Marks, J.D., y otros, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597
 Presta, L.G., y otros, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632
 Presta, L.G., Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992) 593-596
 Riechmann, L., y otros, Nature 332 (1988) 323-327
 Sims, M.J., y otros, J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308

Tijssen, P., "Practice and theory of enzyme immunoassays", R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 221-278; especialmente pp. 43-78

US 2003/0068664

US 5,821,337

5 US 4,816,567

Verhoeyen, M., y otros, Science 239 (1988) 1534-1536

WO 93/21319

REIVINDICACIONES

- 5
1. Método de detección de un anticuerpo terapéutico destinado al uso en un humano en una muestra obtenida de un animal de experimentación que comprende las etapas de
- 10
- a) proporcionar la muestra a analizar,
 - b) incubar dicha muestra con un anticuerpo que se une a dicho anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas de dicho animal de experimentación,
 - c) opcionalmente, incubar dicha muestra con un reactivo adecuado para la detección selectiva del anticuerpo terapéutico total, activo o unido al antígeno, y
 - d) correlacionar el complejo formado en (b) o (c) con la concentración de dicho anticuerpo terapéutico.
- 15
2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho animal de experimentación se selecciona del grupo formado por los miembros de las familias de los tífes y tamarinos, monos del viejo mundo, lémures enanos y ratón, gibones y simios inferiores, lémures verdaderos, así como cruces de los mismos.
- 20
3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque dicho anticuerpo que se une al anticuerpo terapéutico y no se une a las inmunoglobulinas del animal de experimentación es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo depositado en DSM ACC 2708.
- 25
4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además porque dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
- 30
5. Método, según la reivindicación 4, caracterizado además porque dicho anticuerpo humano o humanizado es un anticuerpo monoclonal.
6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se detecta el anticuerpo terapéutico total.
7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se detecta el anticuerpo terapéutico activo.
- 35
8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se detecta el anticuerpo terapéutico que está unido a su antígeno.
9. Utilización de un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico destinado al uso en un humano y no se une a las inmunoglobulinas de un animal de experimentación para determinar la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno en una muestra obtenida de un animal de experimentación.
- 40
10. Utilización, según la reivindicación 9, en la que dicho anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo depositado en DSM ACC 2708.

Fig. 2

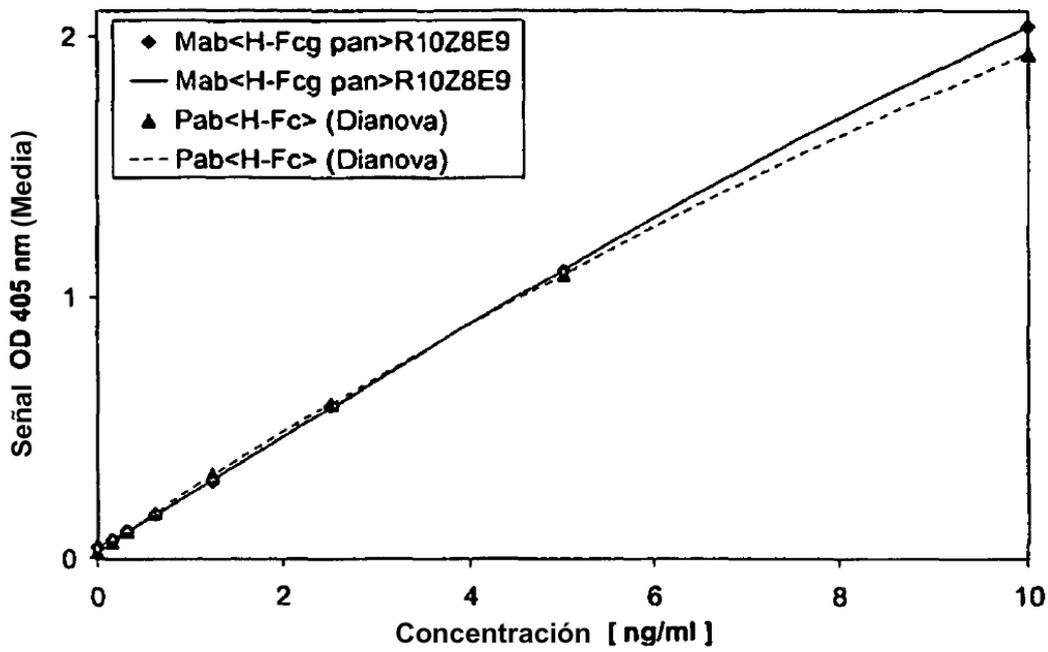


Fig. 3

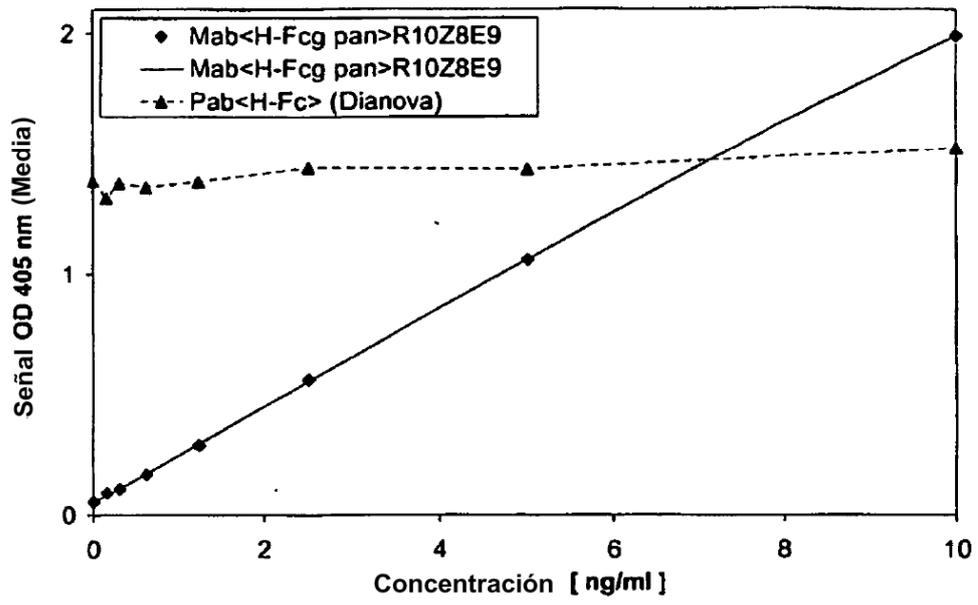


Fig. 4

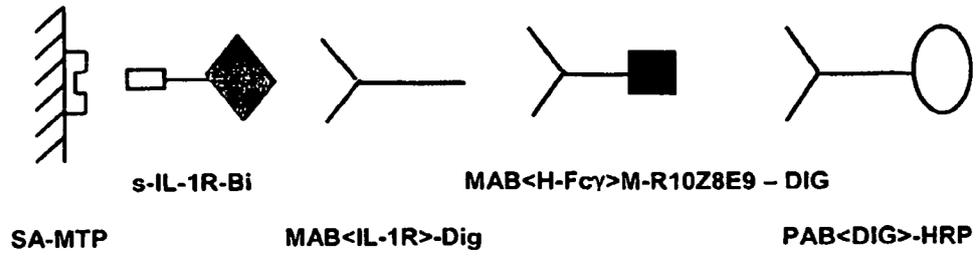


Fig. 5

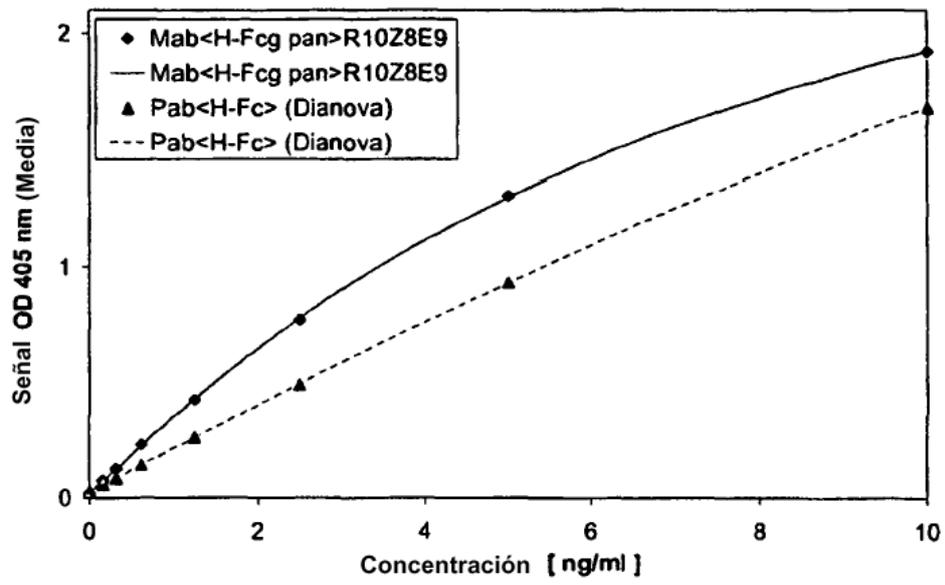


Fig. 6

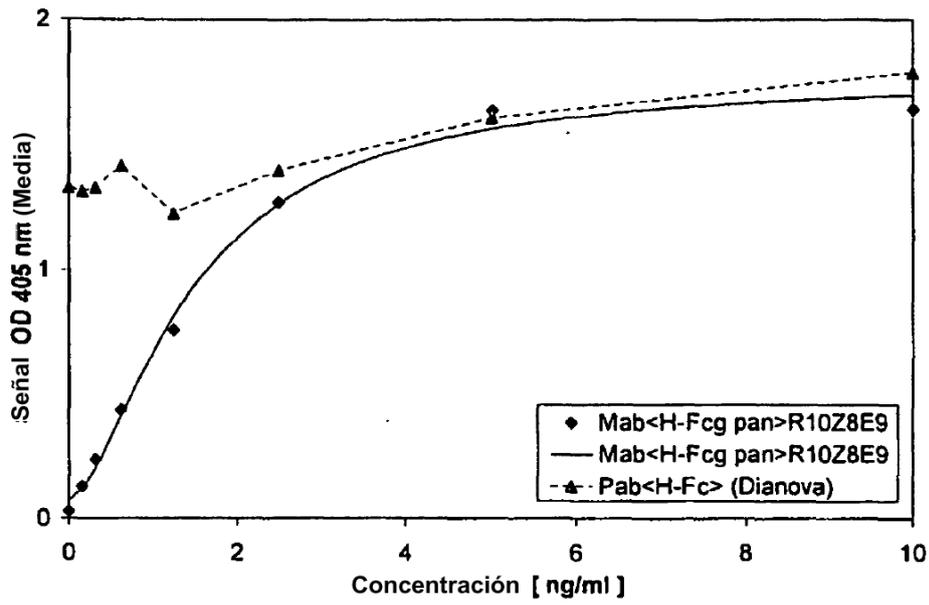


Fig. 7

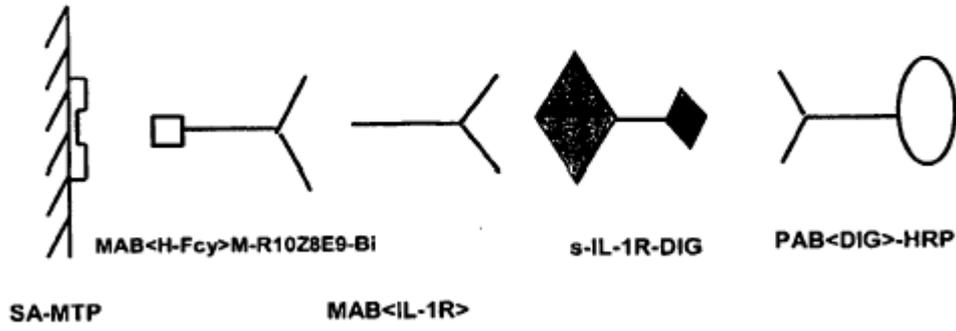


Fig. 8

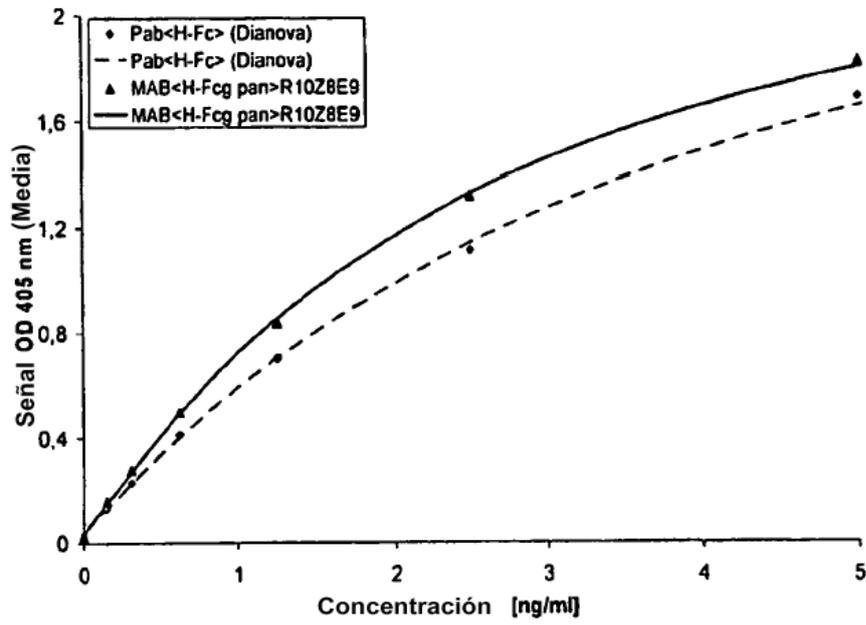


Fig. 9

