



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 059**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07753313 .1**

96 Fecha de presentación : **16.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2005166**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Ensayos para la detección de anticuerpos anti-enzimas lisosómicas.**

30 Prioridad: **17.03.2006 US 783690 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

73 Titular/es: **BIOMARIN PHARMACEUTICAL Inc.**
105 Digital Drive
Novato, California 94949, US

72 Inventor/es: **White, Joleen;**
Flay, Lisa, Argento;
Foehr, Erik;
Taniguchi, Gary;
Prince, William, S. y
Zhao, Bin

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 366 059 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

Ensayos para la detección de anticuerpos anti-enzimas lisosómicas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para identificar fluidos o tejidos corporales para anticuerpos, incluyendo anticuerpos neutralizantes y específicos del isotipo, frente a enzimas lisosómicas administradas como parte de una terapia de sustitución de enzimas.

10 Antecedentes de la invención

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico, conocidas como mucopolisacaridosis (MPS) (Klock *et al.*, *Internat Pediatr.* 9:40-48 (1994); Starr *et al.*, *Glycosylation & Disease* 1: 165-176 (1994)), están provocadas por una deficiencia en una enzima o combinación de enzimas. Estas enfermedades de almacenamiento lisosómico se caracterizan por la acumulación intralisosómica de glucosaminoglucanos sin degradar, excreción urinaria excesiva de glucosaminoglucanos, deterioro mental y físico progresivo, y muerte prematura. Los pacientes nacen habitualmente sin los rasgos clínicos visibles de MPS, pero desarrollan afectación clínica progresiva. Cada tipo de MPS tiene una deficiencia de enzima lisosómica específica con un grado característico de afectación orgánica y velocidad de deterioro. Véase Muenzer, *Adv. Pediatr.* 33:269-302 (1986).

Por ejemplo, MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico en la que los pacientes afectados carecen de la enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB). La enzima metaboliza el resto de sulfato del glucosaminoglucano (GAG) sulfato de dermatano (Neufeld *et al.*, "The mucopolysaccharidoses" *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Eds. Scriver *et al.*, New York: McGraw-Hill, 1989, p. 1565-1587). En ausencia de la enzima, la degradación por etapas del sulfato de dermatano está bloqueada, y el sustrato se acumula intracelularmente en el lisosoma en una amplia variedad de tejidos. La acumulación provoca un trastorno progresivo con afectación de múltiples órganos y tejidos, en la que el niño parece normal al nacer, pero habitualmente muere antes de la pubertad. El diagnóstico de MPS VI se realiza virtualmente a los 6-24 meses de edad, cuando el niño muestra una deceleración progresiva del crecimiento, un agrandamiento del hígado y del bazo, deformidades esqueléticas, rasgos faciales bastos, obstrucción de las vías respiratorias superiores, y deformidades de las articulaciones. En los niños con MPS VI se puede desarrollar un enturbiamiento progresivo de la córnea, hidrocefalia comunicante, o cardiopatía. La muerte resulta normalmente debida a infección respiratoria o cardiopatía. La MPS VI no está asociada típicamente con la alteración progresiva del estado mental, aunque las limitaciones físicas pueden impactar en el aprendizaje y desarrollo. Aunque la mayoría de los pacientes con MPS VI tienen la forma grave de la enfermedad, que habitualmente es mortal para la edad adolescente, se han descrito pacientes afectados con una forma menos grave de la enfermedad, que sobreviven durante décadas.

Algunos pacientes mueren debido a complicaciones relacionadas con la enfermedad entre la niñez y la madurez temprana. Una forma para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico es mediante terapia intravenosa de sustitución de enzima (ERT) (Kakkis, *Expert Opin Investig Drugs* 11 (5):675-85 (2002)). La ERT aprovecha la vasculatura para llevar la enzima desde un único sitio de administración a la mayoría de los tejidos. Una vez que la enzima se ha distribuido ampliamente, debe ser captada en las células. La base para la captación en las células se encuentra en un rasgo único de las enzimas lisosómicas: las enzimas lisosómicas constituyen una clase separada de glucoproteínas definidas por fosfato en la posición 6 de restos de manosa terminales. La 6-fosfato de manosa se une con afinidad y especificidad elevadas mediante un receptor encontrado en la superficie de la mayoría de las células (Munier-Lehmann *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* 24(1): 133-6 (1996); Marnell *et al.*, *J. Cell. Biol.* 99(6):1907-16 (1984)). El receptor de 6-fosfato de manosa (MPR) dirige la captación de la enzima desde la sangre al tejido, y después media el enrutamiento intracelular al lisosoma.

Se ha desarrollado ASB humana recombinante (rhASB) como una terapia de sustitución de enzimas para el tratamiento de MPS VI. rhASB se interna en el lisosoma a través del receptor de manosa-6-fosfato independiente de calcio (CIMPR). En este compartimiento subcelular, el bajo pH (pH 4-4,5) y la proteólisis disminuirían o eliminarían la interacción del anticuerpo con rhASB.

Un efecto secundario potencial de la administración de la terapia de sustitución de enzimas (ERT) es el desarrollo de anticuerpos específicos de la enzima en pacientes que reciben múltiples rondas de terapia. Estos anticuerpos específicos de la enzima pueden precipitar sucesos adversos potenciales y cambios en la eficacia clínica, incluyendo reacciones de tipo anafilactoide asociadas con anticuerpos del isotipo IgE, cambios en el perfil farmacocinético, neutralización de la actividad enzimática en el lisosoma, interferencia con la captación de enzima mediada por el receptor, y ruptura de la tolerancia con respecto a las propias proteínas. Los ensayos fiables para medir de forma exacta el desarrollo de anticuerpos anti-enzima permitirían evaluar el régimen de tratamiento en un paciente que recibe ERT, y facilitar un diseño más eficiente de la terapia para el paciente (Mire-Sluis *et al.*, *J. Immunological Methods* 289:1-16 (2004)). De este modo, existe todavía la necesidad en la técnica de ensayos sensibles, fiables, para detectar anticuerpos contra las enzimas lisosómicas útiles en terapia de sustitución de enzimas.

Linthorst *et al.*, *Kidney Int.*, 66(4):1589-1595, 2004 estudian la emergencia y propiedades de anticuerpos frente a una enzima lisosómica, α -galactosidasa A humana recombinante (rh- α -Gal A), con la administración a pacientes con la enfermedad de Fabry. Se describe un ensayo a base de ELISA en el que se inmoviliza rh- α -Gal A sobre placas, y se detectan anticuerpos anti-rh- α -Gal A usando un anti-IgG humana de cabra marcado con peroxidasa. También se describen ensayos para detectar anticuerpos neutralizantes anti-rh- α -Gal A, para medir la actividad enzimática de rh- α -Gal A, detectar complejos de IgG-rh- α -Gal A, y medir la captación de rh- α -Gal A en glóbulos rojos.

Sumario de la invención

La invención se basa en el desarrollo de ensayos específicos y selectivos para medir anticuerpos asociados con compuestos terapéuticos proteicos, incluyendo terapia de sustitución de enzimas para trastornos de almacenamiento lisosómico.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos específicos de enzimas lisosómicas (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) procedente del animal con una primera enzima lisosómica marcada con un resto de captura, y una segunda enzima lisosómica marcada con un resto de detección, para formar un complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica, (b) capturar el complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica procedente de la etapa (a), poniendo en contacto el complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica con un soporte sólido que se une específicamente al resto de captura, y (c) detectar la presencia de anticuerpos específicos de LE en la muestra de fluido corporal detectando la presencia de la segunda enzima lisosómica marcada con el resto de detección.

Un segundo aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos que neutralizan a la enzima lisosómica (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) aislar anticuerpos de iones fosfato y sulfato en una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) del animal, (b) poner en contacto los anticuerpos aislados procedentes de la etapa (a) con una enzima lisosómica para formar un complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica, (c) añadir un sustrato enzimático, y (d) detectar la cantidad de escisión del sustrato enzimático mediante la enzima lisosómica en presencia y ausencia de los anticuerpos aislados en la muestra de fluido corporal, en el que la escisión reducida en presencia, comparada con la ausencia, de los anticuerpos aislados indica la presencia de anticuerpos neutralizantes de LE en la muestra de fluido corporal.

Un tercer aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos que inhiben la captación de enzima lisosómica (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) incubar una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) del animal con una enzima lisosómica marcada con un resto de detección, (b) poner en contacto la mezcla de incubación procedente de la etapa (a) con un receptor de LE o un fragmento del mismo que se une a LE, estando unido dicho receptor de LE o un fragmento del mismo que se une a LE a un soporte sólido, (c) y detectar la unión de la enzima lisosómica marcada con el resto de detección procedente de la etapa (a) al receptor de LE o al fragmento del mismo que se une a LE, en el que una unión reducida en presencia de la muestra de fluido corporal, en comparación con la unión en ausencia de la muestra de fluido corporal, indica que la muestra de fluido corporal contiene un anticuerpo que inhibe la captación de LE.

Un cuarto aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos de isotipo IgE específicos de la enzima lisosómica (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) capturar IgE en una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) procedente del animal poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con anticuerpo específico de IgE unido a un soporte sólido, (b) poner en contacto la IgE capturada procedente de la etapa (a) con una enzima lisosómica marcada con un resto de detección, y (c) detectar la cantidad de anticuerpo de isotipo IgE específico de LE en la muestra de fluido corporal detectando la cantidad de la enzima lisosómica marcada con el resto de detección.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de ensayos sensibles, específicos, para detectar anticuerpos procedentes de fluidos y tejidos corporales de pacientes específicos para enzimas lisosómicas.

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto en la materia una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2ª ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5ª ED., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

Cada publicación, solicitud de patente, patente, y otras referencias citadas en la presente memoria, se incorpora como referencia en su totalidad en el grado en que no sea inconsistente con la presente descripción.

Se observa en este caso que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anejas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia en plural excepto que el contexto dicte claramente otra cosa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos excepto que se especifique de otro modo.

El término “derivado”, cuando se usa en relación con sustancias de anticuerpos y polipéptidos de la invención, se refiere a polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, ubiquitinación, conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente a polímeros, tales como pegilación (derivatización con polietilenglicol), e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no aparecen en las proteínas humanas. Los derivados retienen las propiedades de unión de las moléculas sin derivatizar de la invención.

Las expresiones “resto detectable”, “resto de detección”, o un “marcador”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición detectable por medios que incluyen, pero no se limitan a, espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos, u otros medios físicos. Por ejemplo, los restos o marcadores detectables útiles incluyen catalizador a base de rutenio (Ru), europio, ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos electrónicamente densos, enzimas (por ejemplo, tal como se utiliza habitualmente en un ELISA), biotina-estreptavidina, digoxigenina, haptenos y proteínas para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales, y moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. El resto o marcador detectable a menudo genera una señal medible, tal como una señal radioactiva, cromogénica, de luminiscencia, o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de resto o marcador detectable unido en una muestra.

La expresión “resto de captura”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición que es capaz de ser unida específicamente por otra composición que está unida o enlazada a un soporte sólido. Muchos de los restos de detección anteriores también se pueden usar como restos de captura en tanto que esté implicado un suceso de unión. Por ejemplo, los restos de captura útiles incluyen marcadores de afinidad para los cuales existen ligandos específicos y selectivos (por ejemplo, biotina con avidina, glutatión con GST), haptenos y proteínas para los cuales existen antisueros o anticuerpos monoclonales (por ejemplo, c-Myc), moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana, y péptidos para los cuales existen ligandos específicos y selectivos (por ejemplo una etiqueta de histidina con Ni). También se prevén moléculas que afecten a las características de unión a una resina cromatográfica. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, un filtro, una placa, una membrana, una resina cromatográfica, o una perla.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o restos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima, según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

El término “variante”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia polipeptídica que contiene por lo menos una sustitución, supresión o inserción de aminoácidos en la región codificante con relación a los dominios codificantes polipeptídicos originales. Las variantes retienen la actividad biológica del polipéptido de origen natural. Por ejemplo, se contempla que una enzima lisosómica usada en el procedimiento de la invención puede ser la enzima de origen natural, o puede comprender uno o más cambios de aminoácidos de la enzima de origen natural, pero retiene la actividad biológica de la enzima. Igualmente, un receptor de la enzima lisosómica usado en el procedimiento de la invención puede ser una variante o fragmento del receptor de origen natural, pero retiene la unión a su ligando.

La expresión “enzima lisosómica detectable”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a una enzima lisosómica capaz de ser detectada, por ejemplo, el reactivo de enzima lisosómica está marcado directamente además de su unión inherente a un anticuerpo específico de la enzima lisosómica.

La expresión “anticuerpo específico de IgE”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que tiene una mayor reactividad por un anticuerpo de isotipo IgE, por ejemplo, tiene reactividad cruzada mínima con otros isotipos de anticuerpos, tales como IgG.

La expresión “límite de detección” o “LOD” o “sensibilidad”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la concentración de analito más baja en la muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar como un valor exacto. Por ejemplo, el LOD se puede definir como la concentración de analito que genera consistentemente una señal superior a la respuesta media medible de la matriz sin tratamiento reunida más un factor de punto de corte.

- La expresión “factor de punto de corte” o “umbral”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a un valor que se usa para manipular matemáticamente la señal de la matriz reunida sin tratamiento previo (por ejemplo, suero), para establecer la señal mínima requerida de una muestra para ser considerada positiva. El factor de punto de corte se puede determinar basándose en un intervalo de confianza a partir de un conjunto de muestras procedentes de individuos que no se han expuesto previamente a la enzima lisosómica terapéutica. Por ejemplo, el intervalo de confianza de 95%, calculado como 1,645 multiplicado por la desviación estándar a lo largo de las muestras individuales, conducirá a aproximadamente una tasa de 5% de falsos positivos.
- El término “interferencia”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la presencia de sustancias en las muestras de fluido corporal (por ejemplo, suero) que evitan la detección y medida exactas del analito diana. Tal como se utiliza en la presente memoria, interferencia se refiere generalmente al efecto de un fármaco libre o al efecto de la matriz (por ejemplo, suero) sobre la relación de concentración-respuesta. Por ejemplo, la interferencia de la matriz se puede evaluar como la exactitud relativa de las muestras sin la interferencia potencial para seleccionar como diana un intervalo de exactitud relativa de 75-125%.
- El término “precisión”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la variabilidad en la señal entre los analitos y los días. Por ejemplo, la precisión se puede evaluar como coeficiente de variación, intervalos de valores, o usando estadística de ANOVA.
- La expresión “estabilidad del reactivo”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la robustez de la preparación y estabilidad de los reactivos al almacenamiento. Por ejemplo, la estabilidad del reactivo se puede establecer mediante las condiciones que todavía permitan que se midan valores dentro de la exactitud de 75-125% con relación a reactivos recientemente preparados.
- La expresión “estabilidad de la muestra”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la estabilidad del analito en las muestras de tejido o fluido biológico para manejar condiciones que van a experimentar las muestras recogidas. La estabilidad de una muestra se puede medir como las condiciones que todavía permitan valores a medir dentro de la exactitud de 75-125% con relación a muestras recogidas recientemente. Por ejemplo, la estabilidad de la muestra se puede evaluar a -20°C y a -80°C durante períodos de tiempo iguales a un período típico de almacenamiento, a RT o 4°C durante un período de tiempo igual a la preparación típica de la muestra y tiempos de ejecución analítica, a -20°C, 4°C y RT durante un período de tiempo igual al período típico de transporte, o a través de ciclos de congelación-descongelación que se puedan experimentar.
- El término “robustez”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la capacidad del ensayo para permanecer inafectado por pequeñas variaciones en los parámetros del procedimiento, e indica la fiabilidad del ensayo durante condiciones experimentales normales. Por ejemplo, la robustez se puede evaluar como el porcentaje de cambio de la concentración de reactivo, volumen de reactivo, o tiempo de incubación, que todavía genera una señal dentro de una exactitud de 75-125% con relación a las condiciones nominales.
- El término “especificidad”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a la capacidad del ensayo para detectar anticuerpos que reaccionan con una proteína específica. Por ejemplo, la especificidad se puede referir a una respuesta de detección proporcional con el analito específico, mientras que la respuesta de una muestra de anticuerpo que no es específica para la enzima lisosómica debería de estar por debajo del LOD. La respuesta proporcional se puede evaluar frente a un valor de coeficiente de correlación R mayor o igual a 0,98.
- El término “matriz” o “matrices”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente al contexto biológico en el que se miden los anticuerpos. Los ejemplos de matrices incluyen, por ejemplo, fluido y tejido corporal.
- La expresión “fluido corporal”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un fluido que se obtiene de un sujeto, por ejemplo un ser humano. Por ejemplo, un fluido corporal puede ser sangre, fluido cerebroespinal (CSF), u orina. La sangre se puede fraccionar para eliminar células (*es decir*, plasma), o se puede fraccionar para eliminar células y factores de coagulación (*es decir*, suero).
- El término “tejido”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a tejidos que se obtienen de un sujeto, por ejemplo un ser humano. Por ejemplo, un tejido puede proceder de una muestra de biopsia, tejido eliminado quirúrgicamente, o recogida post-mortem. Además, el tejido se puede homogeneizar y extraer para aislar los anticuerpos del tejido.
- La expresión “sin tratamiento previo”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a individuos, por ejemplo seres humanos, que no han sido expuestos previamente al agente terapéutico de LE, pero pueden haber estado expuestos a niveles endógenos.

Variantes

- En ciertas realizaciones, se pueden preparar análogos y variantes de la enzima lisosómica (LE) o del receptor de LE, y serán útiles en una variedad de aplicaciones en las que se pueden usar las enzimas lisosómicas y sus receptores.

LE o los fragmentos de LE incluyen la enzima de longitud completa, o cualquier variante, fragmento o modificación de la misma que retenga por lo menos parte de la actividad biológica (*es decir*, actividad enzimática) de la enzima de longitud completa. El receptor de LE o los fragmentos que se unen a LE incluyen el receptor de longitud completa, una porción extracelular del receptor, o cualquier variante, fragmento o modificación del mismo que retenga por lo menos parte de la actividad biológica (*es decir*, actividad de unión a LE) del receptor de LE de longitud completa. La LE de longitud completa se puede aislar de fuentes naturales, o se puede preparar usando técnicas recombinantes. Los fragmentos de LE se pueden preparar usando técnicas recombinantes. Los receptores de LE se pueden aislar de fuentes naturales (por ejemplo, se pueden purificar a partir de suero fetal bovino), o se pueden preparar usando técnicas recombinantes. Por ejemplo, una estrategia general para generar receptores de LE de longitud completa recombinantes, o porciones extracelulares de receptores de LE, o variantes, o variantes, fragmentos o modificaciones de los mismos que retengan actividad de unión a LE, es amplificar la región codificante de interés a partir del ADNc del receptor de LE mediante PCR, clonar el ADNc en un vector de expresión de mamífero, transfectar el vector de expresión de mamífero en células de mamífero, por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO) o células G.7.1, y purificar el receptor de LE usando procedimientos para aislar receptores de LE desprendidos de células presentes en suero fetal bovino. Los receptores de LE o sus variantes pueden ser de fuentes humanas o de otros mamíferos.

Las variantes de las secuencias de aminoácidos de LE o de receptores de LE pueden ser, por ejemplo, variantes de sustitución, de inserción o de supresión. Las variantes de supresión carecen de uno o más restos de la LE o del receptor de LE nativo, que no son esenciales para la función y/o actividad inmunogénica. Los mutantes de inserción implican típicamente la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo, o simplemente un único resto. Las adiciones terminales son adiciones de secuencias de aminoácidos en el término N o C de la LE o del receptor de LE. Las adiciones terminales se pueden usar para mejorar las características biofísicas de la LE o del receptor de LE, o simplemente mejorar la purificación. Las adiciones peptídicas incluyen, por ejemplo, y sin limitación, HIS (por ejemplo, 6 ó 12), TAT, FLAG™, HA, c-Myc, VSV-G, V5, péptido S, y HSV. Las adiciones proteicas incluyen, por ejemplo, y sin limitación, GFP, MBP, y GST.

Las variantes de sustitución intercambian típicamente un aminoácido de la LE o del receptor de LE de origen natural por otro en uno o más sitios, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades de la LE o del receptor de LE, tal como la estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de este tipo son preferentemente conservativas, *es decir*, se sustituye un aminoácido por otro de forma y carga similar.

Las variantes pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas a la LE o al receptor de LE de origen natural. En el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, sustancialmente homólogos se refiere generalmente a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen por lo menos 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de restos nucleotídicos o de restos de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, según se mide usando algoritmos de comparación de secuencias bien conocidos en la técnica, o mediante inspección visual.

Marcadores (restos detectables y de captura)

En algunas realizaciones, se marca un reactivo de ensayo para facilitar su detección. Un marcador o un resto detectable es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos, u otros medios físicos. Los anticuerpos se pueden marcar detectablemente a través del uso de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, *etc.*), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, *etc.*), marcadores fluorescentes (tales como FTTC o rodamina, *etc.*), o marcadores luminiscentes o bioluminiscentes (tales como europio, vanadio, *etc.*), átomos paramagnéticos, marcadores electroquimioluminiscentes (tales como marcadores a base de Ru en conjugación con sustratos, *etc.*), y similares.

En algunas realizaciones, un reactivo de ensayo se marca para facilitar su captura. Un resto de captura es una composición que es capaz de ser unida específicamente por otra composición que está unida o enlazada a un soporte sólido. Un reactivo de ensayo, por ejemplo enzima lisosómica, se puede marcar mediante el uso de marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, *etc.*) para los que existen ligandos específicos y selectivos, haptenos y proteínas para los que existen antisueros o anticuerpos monoclonales, y moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. Los procedimientos para lograr dicho marcaje se describen en Sternberger *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 18:315. (1970); Bayer *et al.*, Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval *et al.*, Immunol. 109:129 (1972); Goding, J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)). El soporte sólido puede ser un filtro, placa, membrana o perla, y similar.

Los ejemplos de marcadores adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, marcadores radioactivos (por ejemplo, ³²P), fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína), reactivos eléctricamente densos, enzimas (por ejemplo, como se usan normalmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos así como proteínas que se pueden hacer detectables, por ejemplo incorporando un radiomarcador en el hapteno o péptido, o se pueden usar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o péptido. También se

contemplan una nanoetiqueta, una perla de masa molecular, un agente magnético, una nano- o microperla que contiene un colorante fluorescente, un punto cuántico, una perla cuántica, una proteína fluorescente, dendrímeros con un marcador fluorescente, un microtranspondedor, una molécula o estructura molecular donante de electrones, o una partícula que refleje la luz.

Por ejemplo, los marcadores contemplados para uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína, rojo Tejas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina u otras usadas normalmente en un ELISA), biotina, y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal, perlas de vidrio o de plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, *etc.*), y marcadores luminiscentes o quimioluminiscentes (por ejemplo, europio (Eu), MSD Sulfo-Tag).

El marcador se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado del ensayo. Preferentemente, en una realización, el marcador se une covalentemente al biopolímero usando un isocianato o N-hidroxisuccinimida, reactivo de éster para conjugación de un agente activo según la invención. En un aspecto de la invención, los reactivos de isocianato bifuncionales de la presente invención se pueden usar para conjugar un marcador a un biopolímero para formar un conjugado de biopolímero con el marcador sin un agente activo unido al mismo. El conjugado de marcador con biopolímero se puede usar como un intermedio para la síntesis de un conjugado marcado según la invención, o se puede usar para detectar el conjugado de biopolímero. Como se indica anteriormente, se puede usar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el componente deseado del ensayo, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible, y las provisiones de desechos. A menudo, los marcadores no radioactivos se unen por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando se une entonces a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), que es detectable inherentemente o que se une covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente, o a un soporte sólido, tal como un filtro, una placa, una membrana o una perla, y similar.

Los compuestos útiles en el procedimiento de la invención también se pueden conjugar directamente a compuestos que generan señales, por ejemplo mediante conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas adecuadas para uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glucosidasas, u oxidasas, particularmente peroxidasa. Los compuestos fluorescentes, *es decir*, fluoróforos, adecuados para uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, *etc.* Otros ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina, rodamina B, cloruro de sulfonilo, eritrosceína, rutenio (tris, bipyridinio), europio, rojo Tejas, nicotinamida adenina dinucleótido, flavina adenina dinucleótido, *etc.* Los compuestos quimioluminiscentes adecuados para uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, europio (Eu), samario (Sm), luciferina y 2,3-dihidroftalazindionas, por ejemplo luminol. Los compuestos electroquimioluminiscentes adecuados para uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, MSD TAG, MSD Sulfo-TAG, BV-TAG, y BV-TAG Plus. Para un repaso de los diversos sistemas marcadores o productores de señales que se pueden usar en los procedimientos en la presente invención, véase la patente U.S. nº 4.391.904.

Procedimientos de detección y kits

Cuando el marcador es radioactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o película fotográfica, como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, la excitación del fluorocromo con la longitud de onda apropiada de la luz, y la detección de la fluorescencia resultante, pueden detectarlo. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a cargas (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Igualmente, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima, y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Otros sistemas de marcaje y de detección adecuados para uso en los procedimientos de la presente invención serán fácilmente manifiestos para los expertos en la materia. Dichos moduladores y ligandos marcados se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o afección de salud.

Los marcadores quimioluminiscentes se pueden detectar observando la luz emitida al reaccionar el marcador con un sustrato. Los marcadores electroquimioluminiscentes se pueden detectar observando la luz emitida al reaccionar el marcador con un sustrato en un campo eléctrico.

En algunas realizaciones, las composiciones marcadas útiles en los procedimientos de la invención se enlazan a un soporte sólido, incluyendo, pero sin limitarse a, filtros, placas o membranas. Se contempla además que los compuestos marcados se pueden marcar e interaccionar en disolución. Por ejemplo, el anticuerpo de captura se puede marcar con una molécula donante de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), y la molécula diana se marca con una molécula aceptora de FRET, de manera que las moléculas están próximas cuando se produce la unión. Como alternativa, la molécula diana se puede marcar con el donante de FRET, y la molécula de anticuerpo con el aceptor de FRET. Otra posibilidad es separar la molécula extintora y fluorescente presentes ambas

en el anticuerpo o diana cuando la diana y el anticuerpo se hibridan. La molécula diana sólo está suficientemente cerca para que su marcador emita si está interaccionando con el reactivo. Esto produce un sistema en el que la molécula sólo emite cuando interacciona con el reactivo (monitorización directa). Se puede usar un filtro de paso de banda estrecho para bloquear todas las longitudes de onda excepto la del marcador de la molécula. Los pares de moléculas de FRET están comercialmente disponibles en la técnica (por ejemplo, de Invitrogen), y se pueden usar según el protocolo del fabricante. Las emisiones de FRET se detectan usando técnicas de formación de imágenes ópticas, tales como una cámara CCD.

Otro procedimiento para detectar las interacciones anticuerpo-antígeno es marcar con un donante de electrones. Este marcador donante daría electrones a un contacto eléctrico al que esté unido el reactivo. Véase, por ejemplo, Ghindilis, *Biochem Soc Trans.* 28:84-9, (2000) y Dai *et al.*, *Cancer Detect Prev.* 29:233-40 (2005), que describen enzimas útiles en y procedimientos para electroinmunoensayos. El contacto electrónico se leería entonces mediante un convertidor A a D (análogo a digital), y se cuantificaría. Cuanto mayor es el recuento electrónico, más interacciones tienen lugar.

Una realización de un marcador capaz de la detección de una sola molécula es el uso de partículas de resonancia de plasmones (PRP) como informadores ópticos, como se describe en Schultz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:996-1001 (2000), incorporada en la presente memoria como referencia. Las PRP son nanopartículas metálicas, típicamente de 40-100 nm de diámetro, que dispersan la luz elásticamente con eficiencia notable debido a una resonancia colectiva de los electrones de conducción en el metal (*es decir*, la resonancia de plasmones de la superficie). La magnitud, la longitud de onda del pico, y la anchura espectral de la banda de la resonancia plasmónica asociadas con una nanopartícula dependen del tamaño de la partícula, de la forma, y de la composición del material, así como del entorno local. Influyendo sobre estos parámetros durante la preparación, se pueden formar PRP que tengan un pico de dispersión en cualquier parte en el intervalo visible del espectro. Para las PRP esféricas, tanto la longitud de onda de dispersión del pico, la eficiencia de la dispersión incrementa al aumentar el radio, proporcionando un medio para producir marcadores coloreados diferentemente. Por ejemplo, las poblaciones de esferas de plata se pueden preparar reproduciblemente, para las cuales la longitud de onda de la dispersión del pico está dentro de unos pocos nanómetros de la longitud de onda buscada, ajustando el radio final de las esferas durante la preparación. Debido a que las PRP son brillantes, aunque de nanotamaño, se usan como indicadores para la detección de moléculas individuales; esto es, la presencia de una PRP unida en un campo de visión puede indicar un suceso de unión individual.

En una realización ejemplar, el dispositivo de ensayo es una tira de ensayo de flujo lateral, opcionalmente encerrada en un alojamiento. Un primer anticuerpo marcado contra una enzima lisosómica está en disolución, mientras que un segundo anticuerpo contra una enzima lisosómica se inmoviliza en la tira de ensayo. Cuando se pone en contacto una muestra de paciente que contiene una enzima lisosómica con ambos anticuerpos, se forma un complejo de sándwich de anticuerpo-diana-anticuerpo, y el complejo resultante, que está inmovilizado sobre el soporte sólido, es detectable en virtud del marcador. La tira de ensayo se inserta entonces en un lector, en el que se mide la señal procedente del marcador en el complejo. El resultado puede ser un resultado positivo o negativo, o una determinación cuantitativa de la concentración de una enzima lisosómica en la muestra, que se correlaciona con un resultado indicativo de riesgo o presencia de una enfermedad o trastorno. Todo el proceso se puede automatizar y/o se puede controlar por ordenador. Como alternativa, la tira de ensayo se puede leer visualmente mediante comparación con un patrón visual del color apropiado. Este ensayo proporciona información clínicamente relevante similar como un ELISA de enzima lisosómica, pero en un tiempo significativamente menor y en el lugar de los cuidados.

Los complejos de antígeno-anticuerpo también se pueden detectar usando técnicas derivadas de nanopartículas. Véase, por ejemplo, Ao *et al.*, *Anal Chem.* 78:1104-6 (2006), que describe la extinción de nanopartículas de oro, Tang *et al.*, *Biosens Bioelectron.* 30 de noviembre de 2005, que describe superficies de nanopartículas de SiO₂(2)/Au en la detección de anticuerpos, y Lieu *et al.*, *J Immunol Methods.* 307:34-40 (2005), que describe nanopartículas de dióxido de silicio que contienen fluoresceína para uso en inmunoensayo de fosforescencia a temperatura ambiente en sustrato sólido (SS-RTP-IA).

También se contemplan kits dentro del alcance de la invención. En una realización, el kit comprende una enzima lisosómica, opcionalmente enlazada a un marcador detectable o a un resto de captura, y/o un patrón de anticuerpo que se une específicamente a la enzima lisosómica, y/o un patrón de enzima lisosómica que contiene una cantidad conocida de una enzima lisosómica. En otra realización, el kit comprende un sustrato de enzima lisosómica, y/o un patrón de enzima lisosómica que contiene una cantidad conocida de una enzima lisosómica, y/o un patrón de anticuerpo que se une específicamente a, y neutraliza la actividad enzimática de, la enzima lisosómica. En otra realización, el kit comprende una enzima lisosómica, opcionalmente enlazada a un marcador detectable, y/o un receptor lisosómico que se une específicamente a la enzima lisosómica, y/o un patrón de anticuerpo que se une específicamente a, y bloquea la unión del receptor lisosómico a, la enzima lisosómica. En otra realización, el kit comprende una enzima lisosómica, opcionalmente enlazada a un marcador detectable, y/o un anticuerpo que se une específicamente a anticuerpos de isotipo IgE, y/o un patrón de anticuerpo que se une específicamente a la enzima lisosómica, y/o un patrón de enzima lisosómica que contiene una cantidad conocida de una enzima lisosómica. Otros componentes de los kits pueden incluir opcionalmente reactivos y/o instrucciones para llevar a cabo

inmunoensayos, como se describe *más arriba*.

También se pueden usar marcadores de absorción espectral. Una metodología posible para la detección sería mezclar en la perla materiales poliméricos diferentes que absorban y dejen pasar diferentes espectros de luz. Cada tipo diferente de perla se detectaría haciendo pasar una luz multiespectral a través de la perla, y detectando qué espectros son absorbidos.

Enzimas lisosómicas

Las enzimas lisosómicas son útiles como compuestos terapéuticos, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol/enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber/enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, leucodistrofia de células globoides/enfermedad de Krabbe, enfermedad de almacenamiento de glucógeno II/enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I/enfermedad de Tay-Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II/enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, alfa-manosidosis tipos I/II, alfa-manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolipidosis tipo I/sialidosis tipos I/II mucopolipidosis tipos II/III, enfermedad de células I, mucopolipidosis tipo IIIC, polidistrofia pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis tipo I (MPS I), mucopolisacaridosis tipo II síndrome de Hunter (MPS II), mucopolisacaridosis tipo IIIA síndrome de Sanfilippo (MPS IIIA), mucopolisacaridosis tipo IIIB síndrome de Sanfilippo (MPS IIIB), mucopolisacaridosis tipo IIIC síndrome de Sanfilippo (MPS IIIC), mucopolisacaridosis (MPS) tipo IIID síndrome de Sanfilippo (MPS IIID), mucopolisacaridosis (MPS) tipo IVA síndrome de Morquio (MPS IVA), mucopolisacaridosis tipo IVB síndrome de Morquio (MPS IVB), mucopolisacaridosis tipo VI (MPS VI), mucopolisacaridosis tipo VII síndrome de Sly (MPS VII), mucopolisacaridosis tipo IX (MPS IX), deficiencia múltiple de sulfatasas, enfermedad de Pome, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Batten CLN1, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Batten CLN2, enfermedad de Niemann-Pick tipos A/B, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, y enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, Krabbe y Tay-Sachs, en las que una deficiencia de proteína lisosómica contribuye al estado mórbido. En realizaciones particularmente preferidas, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es MPS VI. En otra realización preferida, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Pompe.

En una realización particular, la invención proporciona procedimientos para detectar anticuerpos contra una proteína terapéutica que tiene una actividad biológica que está reducida, es deficiente, o está ausente en el lisosoma diana, y que se administra al sujeto. Los compuestos terapéuticos preferidos incluyen, pero no se limitan a, aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, lamp-2, alfa-galactosidasa A, ceramidasa ácida, alfa-L-fucosidasa, beta-hexosaminidasa A, deficiencia del activador de GM2, alfa-D-manosidasa, beta-D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposina B, neuraminidasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa fosfotransferasa, subunidad y de fosfotransferasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, acetilCoA:N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa 6-sulfatasa, alfa-galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, palmitoil protein tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, traficante de colesterol, catepsina K, beta-galactosidasa B, α -glucosidasa, y transportador de ácido siálico. En una realización preferida, alfa-L-iduronidasa, α -glucosidasa o N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa es la enzima.

Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos se pueden purificar usando técnicas estándar en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. La composición de anticuerpos, preparada a partir de células microbiano o de mamífero o de suero, se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc inmunoglobulínico que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para todas las $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-75 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa o acrilamida, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , es útil para la purificación la resina Bakerbond A-BX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Dependiendo del anticuerpo a recuperar, también existen otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía de SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio.

Materiales soporte sólidos

Para los procedimientos de la invención, el anticuerpo o la enzima lisosómica se puede unir a una variedad de soportes sólidos, incluyendo, pero sin limitarse a, filtros, membranas de PVC, membranas de PDVF, placas de PVC y otras placas que unen proteínas, microsoportes, perlas en fase macrosólida, perlas magnéticas, hechas, por ejemplo, de poliestireno, nanopartículas, tales como nanopartículas bimetalicas de plata-oro (Yan Cui *et al.*, J. Phys. Chem. B 110 (9): 4002-06 (2006), y láminas de membrana de poliamida (PAM) (Sun *et al.*, Analytical Letters 34:1627-37 (2001)).

Por ejemplo, como etiquetas de identificación, se pueden utilizar microesferas con múltiples rellenos moleculares fluorescentes, diferentes materiales, textura de la superficie, patrones de la superficie, etc. Se contempla que el anticuerpo de captura o la enzima lisosómica esté unida covalentemente a la perla y reaccione contra la pareja de unión opuesta para ensayar en suero la cantidad de anticuerpo específico de la enzima lisosómica. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Unit 6.11, 2006). Las microesferas llenadas fluorescentemente están disponibles actualmente de Molecular Probes, Inc., y otras compañías. Existen actualmente microesferas tan pequeñas como 20 nm de diámetro de perlas de poliestireno.

Las enzimas lisosómicas o los anticuerpos se unen al soporte sólido usando protocolos estándar en la técnica, por ejemplo como se describe por el fabricante del soporte, o usando técnicas de reticulación química estándar conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, kits de reticulación de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

1. Ensayo para detectar anticuerpos específicos de la enzima lisosómica

La mayoría de los compuestos terapéuticos proteicos provocan cierto nivel de respuesta de anticuerpos. En algunos casos, esta respuesta de anticuerpos puede conducir a graves efectos secundarios, o a la pérdida de eficacia. En este caso, el objetivo fue desarrollar un ensayo que pudiese detectar la respuesta de anticuerpos totales a la enzima lisosómica (LE), independientemente de la subclase o isotipo Ig del anticuerpo específico.

En el primer aspecto, la invención contempla un procedimiento para detectar anticuerpos específicos contra enzimas lisosómicas (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) procedente del animal con una primera enzima lisosómica marcada con biotina y una segunda enzima lisosómica marcada con un resto de detección para formar un complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica, (b) capturar el complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica procedente de la etapa (a) con una placa revestida con estreptavidina, y (c) detectar en la muestra de fluido corporal la presencia de anticuerpo específico de LE capturado, detectando la presencia de la segunda enzima lisosómica marcada con el resto de detección.

En una realización, la invención contempla un inmunoensayo formador de puentes para detectar anticuerpos específicos contra arilsulfatasa B humana recombinante (rhASB), independiente del isotipo Ig y de la especie hospedante, tolerante a fármaco libre en el fluido corporal, y con una sensibilidad de ng/ml. Para ensayar la inmunogéinicidad de la enzima, se implementó el formato de puente del ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLA), para desarrollar un ensayo más sensible con tolerancia mejorada a fármaco libre en las muestras de fluido corporal (por ejemplo, suero). El formato de puente aprovecha la bivalencia del analito del anticuerpo preparando la enzima lisosómica con restos o agentes de captura y de detección separados. Este formato de ensayo detecta anticuerpos independientemente de la especie o isotipo. La incubación simultánea en fase de disolución de los reactivos de detección y de captura proporciona la capacidad para usar grandes incubaciones para reducir la interferencia de fármaco libre, permitiendo el intercambio de reactivos con cualquier fármaco libre unido a los anticuerpos en las muestras de fluido corporal (por ejemplo, suero). Debido a que el formato del ensayo incorpora menor número de lavados, el ensayo es capaz teóricamente de detectar anticuerpos de afinidad más baja.

Un aspecto crítico para desarrollar un ensayo de anticuerpos específicos de LE adecuado fue encontrar una manera para marcar la LE con un resto de detección o con un resto de captura de manera que se optimice la sensibilidad, a la vez que se minimice el número de epítomos que se bloquean. Para lograr esto, se evaluaron múltiples químicas de marcaje y relaciones de exposición para generar un intervalo de relaciones de marcaje en el producto final. Para asegurarse de que se enmascaraba el número más bajo de epítomos, se seleccionó la relación de marcaje más pequeña que generó señales adecuadas.

Dos beneficios de la interacción de estreptavidina-biotina son su fortaleza y su especificidad. Estas propiedades hacen a este emparejamiento una opción excelente para el resto de captura; sin embargo, la fuerza de unión presenta un reto al desarrollo del ensayo, debido a que la interacción de la LE marcada con un resto de captura de biotina con el soporte sólido recubierto con estreptavidina secuestra de la disolución la LE de captura. La genética de la unión cambia en la fase sólida, de manera que una relación optimizada de LE de detección y LE de captura ya no genera una señal adecuada. Para minimizar este efecto, se separó la etapa de preincubación de los reactivos de LE y del fluido corporal de la etapa de captura en la placa de estreptavidina, y se optimizaron separadamente las dos etapas de incubación. Un enfoque alternativo sería optimizar específicamente las relaciones de reactivos para las

interacciones de fase sólida/fase en disolución mixtas.

En una realización preferida, el ensayo formador de puente se desarrolla en el lector de placas MesoScale Discovery (MSD) Sector PR400. El ensayo formador de puente usa dos reactivos de rhASB, uno marcado con biotina, y el otro marcado con MSD Sulfo-TAG. Para el ensayo, se prepara rhASB con una etiqueta o marcador tal como biotina (biotin-rhASB, Pierce EZ-Link) para la captura, y una segunda etiqueta, por ejemplo rutenio (MSD Sulfo-TAG NHS-Ester), para la detección. Se genera una señal en el formato de ECL cuando un anticuerpo se une a una biotina-rhASB y a una Ru-rhASB. El fluido corporal (por ejemplo, suero) se incuba toda la noche con la rhASB marcada antes de la incubación en una placa de estreptavidina, para reducir la interferencia procedente del fármaco libre presente en las muestras de fluido corporal. Para confirmar los resultados positivos, las muestras de fluido corporal se incuban con un exceso de rhASB sin marcar, para confirmar una interacción específica a través de una reducción en la señal. El valor dado es un valor de título que corresponde al factor de dilución más elevado que sigue siendo positivo.

El ensayo se puede usar para detectar anticuerpos específicos de LE en una muestra de fluido o tejido corporal procedente de un sujeto. En una realización preferida, el fluido corporal es suero. En otra realización, el fluido corporal es fluido cerebroespinal (CSF).

En una realización alternativa, la rhASB de captura se marca con un primer marcador fluorescente, y la rhASB de detección, que puede estar previamente unida a anticuerpos del suero, se marca con un segundo marcador fluorescente, escogiéndose los marcadores fluorescentes primero y segundo de manera que el dispositivo de detección genera una señal cuando los dos están en estrecha proximidad, *es decir*, enlazados en el mismo complejo con el anticuerpo específico de rhASB procedente del fluido corporal.

En otra realización alternativa, la rhASB de captura se une a un soporte sólido, en lugar de ser marcada con un segundo marcador. Aunque este formato lleva a la reacción de unión a una fase sólida en lugar de una fase en disolución, todavía presenta la oportunidad de unir múltiples isotipos de Ig procedentes de múltiples especies.

En otra realización, la invención contempla un inmunoensayo formador de puente para detectar anticuerpos específicos frente a otra enzima lisosómica, α -glucosidasa humana recombinante (rhGAA), independiente del isotipo Ig y de la especie hospedante, tolerante a fármaco libre en el fluido corporal, y con una sensibilidad de ng/ml.

En una realización alternativa, la rhGAA de captura se marca con un primer marcador fluorescente, y la rhGAA de detección, que se puede unir previamente a anticuerpos del suero, se marca con un segundo marcador fluorescente, escogiéndose los marcadores fluorescentes primero y segundo de manera que un dispositivo de detección genere una señal cuando los dos están en estrecha proximidad, *es decir*, enlazados en el mismo complejo con el anticuerpo específico de rhGAA procedente del suero.

En todavía otra realización alternativa, la rhGAA de captura está unida a un soporte sólido en lugar de ser marcada con un segundo marcador. Aunque este formato lleva a la reacción de unión a la fase sólida en lugar de a la fase en disolución, todavía presenta la oportunidad de unir múltiples isotipos de Ig procedentes de múltiples especies.

2. Ensayo para detectar anticuerpos que neutralizan a la enzima lisosómica (LE)

Debido a que el bajo pH (pH4-4,5) y la proteólisis en el compartimiento lisosómico podrían disminuir o eliminar la interacción del anticuerpo y las enzimas lisosómicas, tales como rhASB, es improbable que el anticuerpo anti-LE inhibiese directamente la actividad enzimática. Sin embargo, existe el potencial para neutralizar la actividad, e interferiría con la eficacia de la terapia enzimática. En este caso, el objetivo fue desarrollar un ensayo para detectar anticuerpos neutralizantes dirigidos contra una enzima lisosómica (LE) administrada como parte de una terapia de sustitución de enzimas en un paciente en el que los anticuerpos aislados del paciente retienen su capacidad para unirse a LE en condiciones en las que la proteína terapéutica unida tiene actividad enzimática.

Un segundo aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos que neutralizan enzimas lisosómicas (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) aislar anticuerpos de iones fosfato y sulfato en una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) procedente del animal, (b) poner en contacto los anticuerpos aislados procedentes de la etapa (a) con una enzima lisosómica para formar un complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica, (c) añadir un sustrato enzimático, y (d) detectar la cantidad de escisión del sustrato enzimático mediante la enzima lisosómica en presencia y ausencia de los anticuerpos aislados en la muestra de fluido corporal, en el que la escisión reducida en presencia, comparada con la ausencia, de los anticuerpos aislados indica la presencia de anticuerpos que neutralizan LE en la muestra de fluido corporal.

Una realización preferida es un ensayo para anticuerpos neutralizantes diseñado para determinar si la actividad enzimática de rhASB está inhibida por suero humano que contiene anticuerpos que se unen a rhASB. El suero contiene múltiples iones, tales como fosfato y sulfato, que interfieren con la medición de la actividad de sulfatasa a través de la inhibición del producto. La eliminación de estas sustancias que interfieren se puede lograr aislando la

fracción del anticuerpo de la matriz sérica a través de una separación por afinidad en condiciones que permiten la recuperación máxima de anticuerpos con actividad de unión a rhASB. En una realización preferida, esto se logra usando una resina conjugada a Proteína A/G. En realizaciones alternativas, la eliminación de las sustancias que interfieren se puede lograr usando una resina conjugada a otras proteínas o combinaciones de proteínas con características de unión al dominio de Ig, incluyendo, pero sin limitarse a, Proteína A, Proteína L, Proteína A/L, y Proteína G/L. Después del aislamiento de los anticuerpos del suero, se identifican las condiciones que permiten la formación de complejos de anticuerpo-LE, bajo las cuales la LE retiene la actividad enzimática. Una etapa de preincubación con LE permite que se formen complejos de anticuerpo-LE antes de la exposición al sustrato enzimático. En una realización preferida, el sustrato es un sustrato fluorogénico sintético. En realizaciones alternativas, el sustrato puede ser polisacáridos de fuentes sintéticas o naturales que contienen sustratos específicos.

Un reto a la hora de desarrollar un procedimiento de purificación de anticuerpos apropiado fue identificar un procedimiento con capacidad y robustez adecuadas. Se investigó un amplio número de soportes, incluyendo perlas magnéticas, placas de unión elevada a proteínas, discos y resinas cromatográficas. El procedimiento que mostró la mayor masa de recuperación con buena capacidad para ser repetido fue una resina de poliacridamida con Proteína A/G unida.

Una vez que se seleccionó la resina, se necesitó desarrollar un procedimiento para eluir y neutralizar los anticuerpos a una condición adecuada (*es decir*, pH, concentración salina, etc.) para la reacción enzimática. Un reto fue identificar condiciones de elución de los anticuerpos que minimizaran la retención de iones fosfato y sulfato. Se usó una intensa investigación con combinaciones de PBS y agua desionizada para identificar condiciones con retención elevada de anticuerpos y retención mínima de fosfato en la resina.

Un reto adicional fue identificar condiciones de neutralización que fuesen aceptables para la reacción enzimática subsiguiente. La neutralización estándar con Tris hasta pH neutro no fue aceptable debido a que es necesario llevar a cabo la reacción enzimática a un pH de aproximadamente 5,6 para una buena reproducibilidad. Se ensayaron múltiples tampones para identificar un candidato apropiado que cumpliera los criterios de mínima interferencia con el ensayo enzimático y máxima robustez a la hora de lograr el mismo pH final, incluso con ligeras perturbaciones en la relación de tampón de elución de glicina y condiciones de neutralización básicas. Se probaron diferentes tampones de elución para sustituir el tampón de elución de glicina estándar, pero el cambio de este tampón dio como resultado una menor robustez de la elución de los anticuerpos.

El ensayo se puede usar para detectar anticuerpos que neutralizan LE en una muestra de fluido o tejido corporal procedente de un sujeto. En una realización preferida, el fluido corporal es suero.

3. Ensayo para detectar anticuerpos que inhiben la captación de enzima lisosómica (LE)

Los anticuerpos neutralizantes que interfirieron con la unión de un compuesto terapéutico con su receptor limitarían la captación del fármaco, interfiriendo de ese modo con la eficacia del tratamiento farmacéutico. De este modo, existe la necesidad en la técnica de desarrollar un procedimiento para detectar la neutralización de ligandos receptores mediada por anticuerpos. En este caso, el objetivo fue desarrollar un ensayo para detectar anticuerpos que inhiban la captación de LE mediada por el receptor de LE cuando la propia LE tiene múltiples epítomos que se pueden usar para que se una a su receptor de LE cognato.

Un tercer aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos que inhiban la captación de enzima lisosómica (LE) en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) incubar una muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) procedente del animal con una enzima lisosómica marcada con un resto de detección, (b) poner en contacto la mezcla de incubación procedente de la etapa (a) con un receptor de LE o un fragmento del mismo que se une a LE, estando dicho receptor de LE o su fragmento unido a un soporte sólido, y (c) detectar la unión de la enzima lisosómica marcada con el resto de detección procedente de la etapa (a) al receptor de LE o fragmento del mismo, en el que una unión reducida en presencia de la muestra de fluido corporal, en comparación con la unión en ausencia de fluido corporal, indica que la muestra de fluido corporal contiene un anticuerpo que inhibe la captación de LE.

Una realización preferida es un procedimiento para detectar anticuerpos anti-rhASB que inhiben la interacción de la LE con el receptor de manosa-6-fosfato humano. Una realización alternativa es un procedimiento para detectar anticuerpos anti-rhASB que inhiben la interacción de la LE con los otros receptores de manosa-6-fosfato de mamíferos. El uso de un ensayo de unión al receptor puede ser un sustituto para un ensayo de captación celular, puesto que el trabajo previo ha establecido que la unión al receptor es necesario y suficiente para la captación (Dintzis *et al.*, J Biol Chem 269:12159-66 (1994)). Una dificultad significativa a superar en este procedimiento es que rhASB recombinante, al igual que otras enzimas lisosómicas, tiene múltiples restos de manosa-6-fosfato que pueden mediar la unión a, y por tanto la captación mediante, el receptor de manosa-6-fosfato. Una etapa de preincubación para la LE y los anticuerpos asegura que los complejos de los anticuerpos tienen la oportunidad de formarse antes de exponer los complejos al receptor.

Un reto importante a la hora de desarrollar este ensayo fue determinar una combinación de receptor de LE y concentraciones de LE que permitiese la medida de pequeños cambios en la unión. La concentración del receptor de LE se seleccionó de manera que las curvas de unión al receptor de LE imitasen las curvas de unión para una estirpe celular. Para mantener el nivel detectable de la señal de LE elevado a 100%, se seleccionó una

El ensayo se puede usar para detectar anticuerpos que inhiben la captación de LE en una muestra de fluido o tejido corporal procedente de un sujeto. En una realización referida, el fluido corporal es suero.

4. Ensayo para detectar anticuerpos específicos de la enzima lisosómica (LE) de isotipo IgE

Se puede observar una cantidad elevada de anticuerpos IgE específicos de fármacos en algunos pacientes humanos que han mostrado reacciones de hipersensibilidad a la administración de fármacos. Las reacciones alérgicas extremas, tales como la anafilaxis, se pueden asociar con liberación de histamina mediada por IgE, u otros mecanismos celulares. En una reacción alérgica, el analito importante no es IgE sérica total, sino más bien una fracción de la IgE total que es capaz de unirse al fármaco administrado, por ejemplo rhASB, durante la terapia de sustitución de enzimas para la enfermedad de MPS VI. En este caso, el objetivo fue desarrollar un ensayo para detectar anticuerpos de isotipo IgE específicos de LE cuando la mayoría de los anticuerpos, en particular los anticuerpos específicos de LE, por ejemplo anticuerpos anti-rhASB, en el fluido corporal del paciente son de isotipo diferente, en particular el isotipo IgE.

Un cuarto aspecto de la invención es un procedimiento para detectar anticuerpos específicos de la enzima lisosómica (LE) de isotipo IgE en un animal (por ejemplo, un ser humano), que comprende las etapas siguientes: (a) capturar IgE en un muestra de fluido corporal (por ejemplo, suero) procedente del animal poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con el anticuerpo específico de IgE unido a un soporte sólido, (b) poner en contacto la IgE capturada procedente de la etapa (a) con una enzima lisosómica marcada con un resto detectable, y (c) detectar la cantidad de anticuerpos de isotipo IgE específicos de LE en una muestra de fluido corporal, detectando la cantidad de la enzima lisosómica marcada con el resto de detección.

Aunque las reacciones alérgicas significativas a infusiones intravenosas de rhASB entre pacientes MPS VI son raras, existe la necesidad de un ensayo de laboratorio que pueda determinar si los anticuerpos IgE específicos de rhASB están presentes en fluidos corporales (por ejemplo, suero) a niveles significativamente mayores que los niveles de fondo mostrado por individuos que no reciben el fármaco. Niveles nominales de IgE no específica total en suero humano son extremadamente bajos (20-400 ng/ml), en comparación con IgG (6-13 ng/ml). Estos valores pueden dar como resultado una diferencia de hasta 650.000 veces en IgG total a IgE total. Por lo tanto, la presencia de IgG específico de LE es potencialmente una barrera significativa para detectar IgE específica de LE. Para minimizar esta interferencia, la primera etapa de este ensayo captura la fracción de IgE total procedente de suero sobre un soporte sólido, en lugar de un ensayo típico en el que los anticuerpos de cualquier isotipo específicos de LE son capturados a partir del suero mediante la unión a la proteína diana unida al soporte sólido. La detección subsiguiente con LE marcada permite la medición de la subfracción de IgE total que es específica para LE, en lugar de medir el subconjunto de anticuerpos específicos de LE que son del isotipo IgE. Una realización referida es un procedimiento para detectar la presencia de anticuerpos IgE específicos de rhASB en suero humano basándose en inmunoensayo inverso (ELISA de IgE anti-rhASB).

Para minimizar el impacto de IgG específico sobre el formato del ensayo, se identificaron múltiples anticuerpos y anti-IgE humana frente a curvas de IgG humana e IgE humana, para determinar la sensibilidad relativa. El mejor anticuerpo detectó IgE a 0,41 ng/ml más fuertemente que IgG a 300 ng/ml, que corresponde a una afinidad de unión por lo menos aproximadamente 730 veces mayor que para IgE. Puesto que sólo una fracción de IgG capturada inadvertidamente será específica para la LE, este nivel de reactividad cruzada es aceptable.

En una realización alternativa, se emplea un inmunoensayo indirecto. Este formato implica la unión de rhASB a una placa de múltiples pocillos de ELISA, la unión de una muestra de suero a la rhASB, y la detección mediante anti-IgE humana conjugada con HRP o anti-IgE humana biotinilada y estreptavidina-HRP. Este formato fue más sensible a la interferencia de IgG anti-rhASB, de manera que puede ser inadecuado para esta aplicación específica.

En otra realización alternativa, el anticuerpo específico de IgE no está unido a un soporte sólido, sino que está enlazado a un segundo marcador que es detectable cuando está próximo al marcador detectable de la enzima lisosómica, y se deja que los dos reactivos reaccionen en disolución. En una realización ejemplar, el anticuerpo específico de IgE se marca con un primer marcador fluorescente, y la enzima lisosómica detectable, que puede estar unida a anticuerpos séricos, se marca con un segundo marcador fluorescente, escogiéndose los marcadores fluorescentes primero y segundo de manera que un dispositivo de detección da una señal cuando los dos están en estrecha proximidad, es decir, enlazados en el mismo complejo con el anticuerpo específico de la enzima lisosómica (LE).

El ensayo se puede usar para detectar anticuerpos de isotipo IgE específicos de LE en una muestra de fluido o tejido corporal de un sujeto. En una realización preferida, el fluido corporal es suero.

Habiendo descrito de forma general la invención, ahora la misma se puede entender más fácilmente a través de la siguiente referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos se ofrecen sólo para fines ilustrativos, y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, *etc.*), pero, por supuesto, se debería permitir cierto error y desviación experimentales.

Ejemplos

Ejemplo 1

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE ARILSULFATASA B HUMANA PROCEDENTES DE SUERO

El objetivo de este desarrollo de ensayo fue crear un procedimiento para evaluar la inmunogenicidad de arilsulfatasa B humana recombinante (rhASB).

Los anticuerpos usados para desarrollar el ensayo incluyen anticuerpos policlonales, todos los cuales se purificaron usando una columna con Proteína G, seguido de cromatografía de afinidad por rhASB. Las cuatro especies estudiadas fueron oveja (G192), conejo (BP15), mono macaco (grupo), y ser humano (grupo). Para ensayar la especificidad, se usó un anticuerpo policlonal de conejo frente a alfa-L-iduronidasa humana recombinante (anti-rhIDU), para asegurarse que el formato formador de puente no medía anticuerpos frente a otra LE.

Se prepararon diluciones de muestras y mezclas madre de Ru-rhASB y biotina-rhASB en 2% de Bloqueador A [2% de seroalbúmina bovina (BSA) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS)]. En la placa de preincubación se mezclaron volúmenes iguales de Ru-rhASB y biotina-rhASB y diluciones de muestra. La placa de preincubación se incubó a temperatura ambiente (RT). La placa del ensayo con estreptavidina se bloqueó con 150 µl por pocillo de Bloqueador A al 5% a RT o a 4°C. El bloque se retiró de la placa de ensayo, y se transfirieron 50 µl de cada mezcla a la placa de ensayo con estreptavidina bloqueada. La placa de ensayo se incubó a RT, se lavó con 3x PBS-Tween, y se añadieron 150 µl por pocillo de Tampón de Lectura T. La placa se leyó en el aparato Sector PR 400.

Para el ensayo de identificación, los reactivos se preincubaron en primer lugar en una placa de 96 pocillos blanca de unión baja, 30 µl de 4 µg/ml de Ru-rhASB, 30 µl 4 µg/ml de biotina-rhASB y 30 µl de diluciones 1:10 de controles, y a cada pocillo se añadieron las muestras. La placa de preincubación se cerró herméticamente con un cierre hermético de papel metálico, y se incubó a RT en un agitador de placas toda la noche. La placa de estreptavidina MSD (placa de ensayo) se bloqueó con 150 µl de tampón de bloqueo al 5% (BSA al 5%) (Bloqueador A MSD) a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la disolución en la placa de ensayo con estreptavidina se desechó, y se transfirieron 50 µl por pocillo desde las placas de preincubación a la placa de ensayo. La placa de ensayo se cerró herméticamente y se incubó durante 30 minutos a RT en un agitador de placas. La placa se lavó entonces tres veces con tampón de lavado. A cada pocillo se añadieron 150 µl de 2X de Tampón de Lectura T (MesoScale Discovery), y la placa de ensayo se leyó a la longitud de onda apropiada. Las señales para cada muestra y control se compararon con la señal procedente de la dilución 1:10 del conjunto.

Para el ensayo de confirmación, se siguió el protocolo de identificación excepto que se prepararon dos diluciones 1:10 separadas de muestras en 2% de Bloqueador A o 100 µg/ml de rhASB en 2% de Bloqueador A, antes de la incubación con los reactivos de rhASB marcados. La señal de las muestras diluidas en Bloqueador A que contiene rhASB se compararon con la señal de las muestras diluidas en Bloqueador A solo.

Para el ensayo del título, se siguió el protocolo de identificación, excepto que también se diluyeron en serie 3 veces las diluciones 1:10 de las muestras, antes de la incubación con los reactivos de rhASB marcados. La señal de cada dilución se comparó con la señal procedente de la dilución 1:10 del conjunto.

La separación del tiempo de incubación total entre la etapa de preincubación y la incubación en la placa con estreptavidina dio como resultado señales más elevadas con relación al fondo. Se seleccionó un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos en la placa de ensayo con estreptavidina para minimizar el fondo sin sacrificar mucho la señal. La preincubación se optimizó a una incubación nocturna para una señal incrementada a menores concentraciones de anticuerpos sin un incremento significativo en el fondo.

Marcaje de rhASB con biotina y Ru

rhASB se intercambió de tampón en tampón de marcaje (10 mM de fosfato sódico, 150 mM de NaCl, pH 7,8), y se concentró hasta 2 mg/ml. Justo antes del marcaje, se prepararon lotes madre de MSD Sulfo-tag y biotina. Los lotes madre de MSD tag y de biotina se añadieron a relaciones de exposición de 1,25 a 12 veces molar en exceso.

Los tubos se incubaron durante 1 hora a RT en el aparato mecedor Vari-Mix. Las reacciones se paralizaron con 20-

25% v/v de glicina 2 M, y después se intercambiaron de tampón en el tampón de la formulación original tanto para la estabilidad del reactivo como para eliminar la etiqueta libre. La concentración de rhASB se determinó usando un kit Pierce BCA en mg/ml, y se convirtió en concentración molar usando el MW 59687 g/mol.

- 5 Para cuantificar el grado de cuantificación de Ru, se midió la absorbancia a 455 nm, y se calculó la concentración molar de Ru usando el coeficiente de extinción $15400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para cuantificar el marcaje con biotina, se empleó el procedimiento de HABA/avidina.

- 10 Para mejorar la exactitud a la hora de medir el grado de incorporación de biotina, también se investigó un producto de biotina cromogénico (Pierce EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin). En experimentos preliminares, las dos formas diferentes de biotina-rhASB se comportaron de forma similar, pero no se llevó a cabo la caracterización completa de la forma cromógena.
- 15 La optimización de la preparación de reactivos requirió disminuir significativamente la relación de exposición desde las condiciones estándar. Los experimentos demostraron que una relación de exposición de aproximadamente 2,5 tanto para biotina-rhASB como para Ru-rhASB produjo una relación de marcador de aproximadamente 1,5, proporcionando un balance de los marcadores necesarios en rhASB para obtener una señal, mientras que se altera mínimamente rhASB para evitar enmascarar epítomos. Aunque las diferencias en las condiciones fueron moderadas,
- 20 se obtuvo la diferencia más pequeña de señal a fondo cuando se usaron los dos reactivos en relaciones aproximadamente equimolares, como se espera puesto que la señal sólo se obtiene cuando un anticuerpo se une a un Ru-rhASB y a un biotina-rhASB.

Establecimiento de punto de corte del ensayo

- 25 Para determinar la señal que dará como resultado un resultado de ensayo positivo usando sueros sin tratamiento previo procedentes de múltiples individuos (punto de corte), se calculó la señal media del ensayo para múltiples individuos no sometidos a tratamiento previo procedente de tres réplicas, y se calculó la desviación estándar a partir de las medias individuales. La desviación estándar se multiplicó por 1,645, *es decir*, el factor t para un intervalo de confianza de 95% de una cola. El punto de corte se ajustó a un intervalo de confianza de 95% para proporcionar una
- 30 tasa de falsos positivos de 5%.

- Los factores de punto de corte se establecieron ensayando 50 sueros humanos sin tratamiento previo o CSF. Para suero de conejo, suero de rata, suero de felino, y CSF felino, los factores de punto de corte se establecieron ensayando 20 muestras sin tratamiento previo. La desviación estándar entre las señales medias para el suero humano individual estuvo muy próxima a la variabilidad del sistema ($SD = 14-18$), indicando que variaciones para sueros individuales no son un factor significativo para el ensayo. Se observaron distribuciones similares para todas las matrices adicionales ensayadas.

Sensibilidad

- Para determinar la concentración de analito más baja en suero que se puede detectar en este ensayo, pero no cuantificar necesariamente, se prepararon anticuerpos purificados a 50-10.000 ng/ml en suero reunido sin tratamiento previo. La señal procedente de diluciones 1:10 de concentraciones preparadas se comparó con la señal
- 45 procedente de una dilución 1:10 de suero reunido sin tratamiento previo.

- El límite de detección varió dependiendo de la fuente del anticuerpo policlonal, que fue mejor que aproximadamente 250 ng/ml de detección para las cuatro fuentes. El ensayo fue capaz de detectar por lo menos tan poco como aproximadamente 50 ng/ml de anticuerpo policlonal de oveja G192 en suero puro, que corresponde a
- 50 aproximadamente 1,7 ng/ml de concentración final de anticuerpo en la mezcla de ensayo. Una realización alternativa podría usar un anticuerpo monoclonal como control para un suministro más continuo de materiales. La detección de anticuerpos aislados de múltiples especies confirmó que el ensayo formador de fuente fue capaz de detectar anticuerpos con dominios constantes diferentes.

Interferencia por fármaco libre

- Para evaluar el efecto del fármaco libre sobre la relación de concentración-respuesta, se preparó anti-rhASB humano purificado por afinidad a 0,5-50 µg/ml en suero humano sin tratamiento previo que contiene 0-100 ng/ml de rhASB. Las señales procedentes de diluciones de muestras 1:10 se compararon con la dilución 1:10 de suero sin
- 60 tratamiento previo, en un volumen total de 150 µl. El límite de detección se comparó para diferentes concentraciones de suero de rhASB.

- El análisis farmacocinético previo ha demostrado que en el punto de tiempo de 5 h después de 24 semanas de terapia de infusión, ningún paciente tuvo más de 663 ng/ml de rhASB presente en el plasma, y que más de la mitad
- 65 tuvo menos de 100 ng/ml de rhASB. Se anticipó que la concentración en el día 7 después de la infusión, tiempo en el cual se recogieron las muestras de suero, es inferior a 1 ng/ml. El límite de detección se estableció para

concentraciones hasta 10 µg/ml en el caso de que un paciente tuvo una respuesta de anticuerpos que prolongó la curva PK. La sensibilidad de por lo menos aproximadamente 500 ng/ml en suero puro se mantuvo con hasta 10 µg/ml de rhASB en suero puro.

Además, la señal de diluciones de muestras 1:10 en 100 µg/ml de rhASB se comparó con la señal procedente de diluciones de muestras 1:10 en 2% de Bloqueador A. Aunque el ensayo fue tolerante a fármaco libre, la presencia de 100 µg/ml de rhASB en el diluyente de muestras fue capaz de servir como ensayo de confirmación para resultados positivos. Esto correspondería a una concentración de suero de 1 mg/ml, que es improbable que ocurriera en muestras de pacientes reales, puesto que es la concentración de la formulación del fármaco.

Interferencia por la matriz

Para evaluar el efecto de la matriz (*es decir*, suero humano) sobre la relación de concentración-respuesta, se preparó anticuerpo policlonal, purificado mediante afinidad, a 50-50.000 ng/ml en suero reunido sin tratamiento previo, en 10% de suero y en 2% de Bloqueador A. Las señales procedentes de diluciones de muestras 1:10 se compararon a lo largo de las diferentes concentraciones de suero. La exactitud cerca del límite de detección estaba entre 96-110%. Aunque más variable a concentraciones más elevadas, esta variabilidad se puede tolerar puesto que el valor dado a conocer es un valor de título y se determinará a partir de diluciones que produzcan concentraciones de anticuerpos próximas al límite de detección.

Además de suero humano, el ensayo anterior también se ha cualificado o validado en fluido cerebroespinal humano, suero de conejo, suero de rata, suero felino, y CSF felino. En todas esas matrices, la interferencia por la matriz fue significativamente menor que en el formato de ELISA, con un 10% de la matriz o más tolerado en todos los formatos.

La mejora más notable para este formato frente al ELISA se observó para suero felino. En todos los formatos de ELISA ensayados, el factor de dilución mínimo para suero felino fue por lo menos 100 para eliminar el fondo hasta el nivel de 0% de suero. Además, la unión no específica es un reto notable para el ELISA de rhASB, demostrando muchos animales señales elevadas que no pueden competir con la LE libre. El ensayo formador de puente en fase de disolución descrito en la presente memoria no muestra estas señales no específicas elevadas y variables.

Robustez

La variación en el reactivo usado (3,5-4,5 µg/ml de Ru-rhASB y biotina-rhASB) y los tiempos de incubación (tiempos de preincubación de 14-22 h, y tiempos de incubación en la placa de ensayo con estreptavidina de 20-40 min) se usaron para evaluar la robustez del ensayo. Los resultados demostraron que pequeñas variaciones en las concentraciones de reactivos no afectó significativamente a los controles más elevados, pero sí provocó que el control de 100 ng/ml cayese por debajo del punto de corte si la concentración de biotina-ASB fue superior a la concentración Ru-ASB. Si ocurrió esta condición durante el análisis de las muestras, la placa se debería de descartar debido al fallo para detectar el control positivo bajo. El tiempo de preincubación podría oscilar desde 16 h hasta 22 h sin cambios significativos en la señal para todos los controles; la incubación en la placa de ensayo con estreptavidina podría variar de 25-35 min.

Especificidad

Para determinar la especificidad del ensayo para anticuerpos frente a rhASB, se ensayaron muestras de anti-rhASB o anti-rhIDU en suero humano sin tratamiento previo. Anti-rhASB se preparó a 100, 1000, o 50.000 ng/ml, y anti-IDU se preparó a 50.000 ng/ml. Los anticuerpos frente a rhIDU se escogieron como control, puesto que rhIDU también contuvo la modificación postraducciona de manosa-6-fosfato que podría tener potencialmente unión específica a anticuerpos a través de epítomos que no son únicos para rhASB. La señal para 50.000 ng/ml de anti-IDU estuvo por debajo de la señal para 100 ng/ml de anti-rhASB, indicando que el ensayo es muy específico para anticuerpos anti-rhASB.

Estabilidad de reactivos

Para caracterizar la robustez de la preparación y estabilidad durante el almacenamiento de los reactivos de rhASB, se prepararon reactivos de rhASB en múltiples lotes y se usaron para analizar muestras equivalentes de anticuerpo purificado en suero humano sin tratamiento previo. Se almacenaron alícuotas de tres lotes a 4°C, -20°C, y -70°C después de un período de almacenamiento inicial de 7 semanas a 4°C. A lo largo de un período de dos meses, se usaron alícuotas procedentes de diferentes temperaturas de almacenamiento para analizar muestras equivalentes de anticuerpo purificado en suero humano sin tratamiento previo. La robustez de la preparación de reactivos se ensayó obteniendo múltiples lotes pequeños de reactivo y ensayándolos frente a la dilución de control positivo. Aunque se observó variabilidad a lo largo de los lotes, la sensibilidad fue similar. Se usaron tres lotes para ensayar la estabilidad en condiciones de almacenamiento, que se mantuvieron durante un período de 8 semanas a las tres temperaturas de almacenamiento. En el estudio, la validación ha demostrado estabilidad del reactivo hasta 6 meses, con periodos de tiempo más prolongados en investigación continuada.

Idoneidad del sistema

Para evaluar el ruido del sistema para el lector de Sector PR400, se utilizaron placas sin disolución (ruido oscuro), 2x Tampón de Lectura T, o etiqueta libre de MSD. Las tres variaciones se ensayaron tanto en placas no revestidas como en placas con estreptavidina estándar. El ruido oscuro tuvo desviaciones estándar de 14 y 15, respectivamente. El tampón de lectura tuvo desviaciones estándar de 18 y 14, respectivamente. La etiqueta libre tuvo CV de 1,2% en placas sin revestir. Estos números se calcularon a partir de 96 réplicas. La variabilidad para el sistema en ausencia de cualesquiera componentes de ensayo fue aceptable y es improbable que contribuya a la variabilidad en la medida de las muestras.

Precisión

Se determinó la precisión para controles positivos a 100, 1000, y 50.000 ng/ml en suero puro. Dos analistas obtuvieron señales similares de tres muestras a lo largo de un total de cinco días separados. A lo largo de 17 experimentos, el porcentaje de CV para 50 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, y 0 ng/ml de G192 fueron 19%, 10%, 10%, y 7%, respectivamente. Dos analistas obtuvieron valores del título similares a lo largo de un total de tres días separados. Durante los seis experimentos, los valores del título abarcaron no más de dos factores de dilución adyacentes para cada concentración.

Estabilidad de las muestras

Para evaluar la estabilidad de muestras de anticuerpos frente a diferentes condiciones de almacenamiento, los controles se sometieron a múltiples ciclos de congelación-descongelación, múltiples días de almacenamiento a 4 °C, y múltiples días de almacenamiento a 4°C para las disoluciones de identificación 1:10. Para anti-rhASB, la estabilidad de las muestras se estableció a lo largo de 5 ciclos de congelación-descongelación y 3 días de almacenamiento a 4°C para suero puro o diluciones 1:10 de suero puro.

Ejemplo 2**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE α -GLUCOSIDASA HUMANA PROCEDENTES DE SUERO**

El fin de este desarrollo de ensayo fue crear un procedimiento para evaluar la inmunogenicidad de α -glucosidasa humana (rhGAA). Muchas de las mejoras del ensayo incorporadas en el ensayo de rhASB se ensayaron para el ensayo de rhGAA, aunque no todas tuvieron éxito, y fue necesaria una optimización adicional.

Los anticuerpos usados para desarrollar el ensayo fueron tres anticuerpos policlonales de conejo separados (BP32, J8255, J8266), que se purificaron usando una columna con Proteína G, seguido de cromatografía de afinidad por rhGAA.

Se prepararon diluciones de muestras y mezclas madre de Ru-rhGAA y biotina-rhGAA en 2% de Bloqueador A [2% de seroalbúmina bovina (BSA) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS)]. Se mezclaron en una placa de preincubación volúmenes iguales de Ru-rhGAA, biotina-rhGAA y diluciones de muestras. La placa de preincubación se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 18-22 horas. La placa de ensayo con estreptavidina se bloqueó con 150 µl por pocillo de 5% de Bloqueador A a 4°C toda la noche. El bloque se agitó fuera de la placa de ensayo, y se transfirieron 50 µl de cada mezcla a la placa de ensayo con estreptavidina bloqueada. La placa de ensayo se incubó a 25-35 min. RT, se lavó con 3x PBS-Tween, y se añadieron 150 µl por pocillo de Tampón de Lectura T. La placa se leyó en el aparato Sector PR 400.

Para el ensayo de identificación, los reactivos se preincubaron primera en una placa de 96 pocillos blanca de baja unión, 30 µl de 4 µg/ml de Ru-rhGAA, 30 µl de 4 µg/ml de biotina-rhGAA y 30 µl de diluciones 1:10 de controles, y se añadieron las muestras a cada pocillo. La placa de preincubación se cerró herméticamente con un cierre hermético de papel metálico, y se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas toda la noche. La placa con estreptavidina de MSD (placa de ensayo) se bloqueó con 150 µl de tampón de bloqueo al 5% (5% de BSA) (Bloqueador A de MSD) a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la disolución en la placa con estreptavidina se desechó, y se transfirieron 50 µl por pocillo desde las placas de preincubación a la placa de ensayo. La placa de ensayo se cerró herméticamente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas. La placa se lavó entonces tres veces con tampón de lavado. A cada pocillo se añadieron 150 µl de 2X de Tampón de Lectura T (MesoScale Discovery), y la placa de ensayo se leyó a la longitud de onda apropiada.

Marcaje de rhGAA con biotina y Ru

rhGAA se marcó de manera similar como se describe para rhASB en el Ejemplo 1. Los experimentos demostraron que una relación de exposición de aproximadamente 4 tanto para biotina-rhGAA como para Ru-rhGAA produjo una relación de marcador de aproximadamente 3. La optimización subsiguiente podría identificar condiciones que produzcan una relación de marcador de aproximadamente 1-2 para proporcionar un balance de los marcadores necesarios en rhGAA para obtener una señal, mientras que se altera mínimamente rhGAA para evitar enmascarar

epítomos.

Sensibilidad

5 Para determinar la concentración de analito más baja en suero que se puede detectar en este ensayo, pero no cuantificar necesariamente, se prepararon anticuerpos purificados a 250-10.000 ng/ml en suero reunido sin tratamiento previo. La señal procedente de diluciones 1:10 de concentraciones preparadas se comparó con la señal procedente de una dilución equiparable de suero reunido sin tratamiento previo.

10 El límite de detección varió dependiendo de la fuente del anticuerpo policlonal, que fue mejor que aproximadamente 1 µg/ml de detección para las tres fuentes. El ensayo fue capaz de detectar por lo menos tan poco como aproximadamente 250 ng/ml de anticuerpo policlonal de conejo BP32 en suero puro.

Interferencia por la matriz

15 Para evaluar el efecto de la matriz (suero de rata) sobre la relación de concentración-respuesta, se preparó anticuerpo policlonal, purificado mediante afinidad, a 100-10.000 ng/ml en 0, 5, 10, 25, 50 y 100% de suero reunido sin tratamiento previo, en 2% de Bloqueador A. Las señales procedentes de diluciones de muestras 1:10 se compararon con la dilución 1:10 de muestras en 0% de suero. A concentraciones de suero de hasta 25%, la exactitud se mantuvo en el intervalo de 67-119%.

Interferencia por fármaco libre

25 Además, la señal de diluciones de muestras 1:10 en 10 µg/ml de rhGAA se comparó con la señal procedente de diluciones de muestras 1:10 en 2% de Bloqueador A. Aunque el ensayo fue tolerante a fármaco libre, la presencia de 10 µg/ml de rhGAA en el diluyente de muestras fue capaz de servir como ensayo de confirmación para resultados positivos. Esto correspondería a una concentración de suero de 100 µg/ml, que es improbable que ocurriera en muestras de pacientes reales, puesto que es 20% de la concentración de la formulación del fármaco.

Establecimiento de punto de corte del ensayo

30 Para determinar la señal que dará como resultado un resultado de ensayo positivo usando sueros sin tratamiento previo procedentes de múltiples individuos (punto de corte), se calculó la señal media del ensayo para múltiples individuos no sometidos a tratamiento previo procedente de tres réplicas, y se calculó la desviación estándar a partir de las medias individuales. El punto de corte se ajustó a un intervalo de confianza de 95% para proporcionar una tasa de falsos positivos de 5%. La desviación estándar se multiplicó por 1,645, es decir, el factor t para un intervalo de confianza de 95% de una cola.

40 Los factores de punto de corte para matrices humanas se establecieron ensayando por lo menos 50 sueros humanos sin tratamiento previo o CSF humano. Los factores de punto de corte para matrices animales se establecieron ensayando 20 sueros de rata sin tratamiento previo, suero de conejo, suero felino, o CSF felino. Se usaron tres réplicas para cada muestra de suero para equiparar las muestras, que también se analizaron por triplicado. En todos los casos, la desviación estándar entre las señales medias para el suero individual estuvo muy próxima a la variabilidad del sistema (SD = 16), indicando que variaciones para sueros individuales no son un factor significativo para el ensayo.

Idoneidad del sistema

50 El ensayo de rhGAA mostró artefactos de placas con una pérdida de señal a lo largo de las columnas, lo que fue debido a la duración del tiempo entre la adición del tampón de lectura y la lectura de la placa. Una manera factible de soslayarlo fue diseñar un diseño en el que la variabilidad se extendió dentro de las muestras en lugar de entre las muestras.

Ejemplo 3

ENSAYO PARA ANTICUERPOS QUE NEUTRALIZAN ENZIMA LISOSÓMICA

60 Para evaluar la presencia de anticuerpos que neutralizan la actividad de rhASB, se modificó un ensayo de actividad que había sido desarrollado previamente en BioMarin como un ensayo de liberación de lotes para rhASB purificada. La actividad de rhASB se mide mediante la liberación de una molécula fluorescente a partir de un sustrato fluorogénico a pH 5,6, y es un ensayo validado en condiciones libres de suero. El ensayo usa un sustrato sintético, sulfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUS), que es escindido en el sulfato libre y 4-metilumbeliferona (4-MU) por rhASB. El ensayo de actividad es inhibido por fosfato y sulfato, los cuales están presentes en cantidades variables en suero de paciente. Para producir un ensayo para detectar anticuerpos neutralizantes, se desarrolló una etapa de pretratamiento del aislamiento de anticuerpos para eliminar el fosfato y sulfato en condiciones en las que se mantuviese tanto la actividad de unión del anticuerpo como la actividad enzimática de rhASB.

Evaluación del pretratamiento de aislamiento de anticuerpos

Para aislar los anticuerpos del fosfato y sulfato, se seleccionó una etapa de purificación mediante afinidad con Proteína A/G. El procedimiento de resina de Proteína A/G requiere una etapa de elución ácida, que necesita ser llevada nuevamente hasta pH 5,6 a fin de medir subsiguientemente la actividad de rhASB. Antes de ensayar la resina, se estableció que 20 ml de 0,1 M de glicina, pH 2,70, se podrían ajustar hasta pH 5,6 con 6,9 ml de 1 M de acetato de Na, pH 7,20, o 3,4 ml de 2 M de acetato de Na, pH 7,29. También se examinaron tampones de Tris a diversos valores de pH y concentraciones molares, pero fueron menos sensibles a pequeñas diferencias de volumen. El tampón de acetato de Na 1M se seleccionó debido a que el pH fue menos sensible a variaciones en el volumen de acetato de Na.

Se investigaron múltiples enfoques para unir y eluir anticuerpos a Proteína A/G. El primero fue un enfoque de perla magnética, que, aunque reproducible, no tuvo suficiente capacidad de unión para este ensayo. Después, se ensayó una resina de Proteína A/G inmovilizada UltraLink, y mostró buena elución en tanto que la resina se lavó con agua entre las etapas de unión y de elución. La cantidad de anticuerpo eluido fue lineal hasta 100 µl de suero por 100 µl de resina, con una caída a 200 µl de suero. La capacidad de unión se calculó como 600 µg de anticuerpo/100 µl de resina a 200 µl de suero. A fin de asegurar que no se alcanzó la saturación, se llevaron a cabo etapas de unión a suero subsiguientes con 200 µl de una dilución de suero 1:2 incubada con 100 µl de resina, que corresponde a 200 µl de suspensión. La división a la mitad de todos los volúmenes también dio como resultado rendimientos similares, y se adoptó para experimentos posteriores para minimizar el volumen de muestra requerido.

Para simplificar el protocolo e incrementar la producción, se examinó un procedimiento a base de placas con filtración a vacío, además del procedimiento estándar de centrifugación, usando la resina de Proteína A/G inmovilizada UltraLink. Para este procedimiento, las etapas de centrifugación se sustituyeron por etapas de filtración a vacío. El porcentaje de inhibición de las muestras obtenido aplicando anticuerpos purificados en pequeñas cantidades en tres sueros humanos diferentes fue consistente a lo largo de múltiples analistas y días.

Para la purificación de anticuerpos en el formato final, la resina de Proteína A/G se mezcló y se añadieron 100 µl de suspensión a una placa Multiscreen. El líquido se eliminó a vacío, y después se lavó 1x 400 µl de PBS, pH 7,4. El suero se diluyó 1:2 en PBS, pH 7,4, y se usaron 100 µl de la dilución de 2 veces para resuspender la resina. La mezcla se dejó incubar durante 1 h a RT, y el suero se eliminó mediante centrifugación o a vacío. La resina se lavó entonces 1x 400 µl de PBS, pH 7,4, y 2x 400 µl de agua pura. El anticuerpo se eluyó en 2x 10 min. con 200 µl de glicina 0,1 M, pH 2,70. El eluato se neutralizó hasta pH 5,6 mediante adición de acetato sódico 1 M.

Evaluación de la actividad enzimática

El uso de la etapa de aislamiento dio como resultado una composición de tampón alterado con relación al ensayo de liberación de lotes, y se evaluó el efecto de este tampón alterado sobre la linealidad de la actividad de rhASB. Se mezclaron diez µl de disolución madre de rhASB a 0-62,5 ng/ml con 40 µl de tampón de glicina/acetato, y después se incubó con sustrato 4-MUS durante 20 minutos. El sistema de tampón de glicina/acetato no afectó a la capacidad de la disolución de parada de glicina/carbonato para detener la actividad de sulfatasa, y se mantuvo la linealidad y robustez en el tiempo observadas previamente.

La robustez de la etapa de neutralización se evaluó variando de forma intencionada el volumen de glicina 0,1 M, pH 2,70, desde 180-220 µl, y el volumen de acetato de Na 1 M desde 62-76 µl, y evaluando la actividad de 0-62,5 ng/ml de rhASB. Perturbaciones de 10% de la composición del tampón produjeron medidas de la actividad de rhASB dentro del 10% de los valores obtenidos para rhASB en la combinación optimizada de 200 µl de glicina y 69 µl de glicina. Esto indica que no se anticipa que una pequeña variación en el pipeteo provoque errores significativos a la hora de medir la actividad enzimática.

Para medir la actividad enzimática en el formato final, se mezcló anticuerpo purificado con enzima rhASB a 62,5 ng/ml. El anticuerpo purificado (40 µl) en glicina/acetato se combinó con 10 µl de 62,5 ng/ml de rhASB (0,05 M de acetato, pH 5,60, 0,05% de TWEEN-20). La mezcla se incubó en placa negra de fondo plano de baja unión (por ejemplo, Greiner) a 37°C durante 1 hora, para permitir la unión de los anticuerpos a rhASB. A cada pocillo se añadió sustrato de 4-MUS 5 mM previamente calentado (por ejemplo, Sigma) en tampón de ensayo de actividad, y se incubó a 37°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 150 µl por pocillo de tampón de parada (glicina 0,35 M, carbonato 0,44 M). La placa se leyó usando el lector de placas SPECTRAmax Gemini con software SoftMax Pro, con una excitación a 366 nm y una emisión a 446 nm, con un corte a 435 nm.

Especificidad

A fin de evaluar este ensayo para determinar la especificidad, se preincubó rhASB 12,5 ng/ml con diversos anticuerpos anti-rhASB (G1 92, BP14, BP15, J3549, J3550) a 0-150 µg/ml en suero sin tratamiento previo, y anticuerpo anti-Aldurazyme (iduronidasa (IDU) humana recombinante) (BP13) a 40 y 150 µg/ml en suero sin tratamiento previo. Se comparó el nivel de actividad de rhASB con el anticuerpo con relación a suero sin tratamiento

previo y tampón.

Cuatro de los cinco anticuerpos policlonales purificados mediante afinidad anti-rhASB fueron capaces de inhibir la actividad de rhASB con relación a suero sin tratamiento previo: BP14, BP15, J3549, y J3550. La respuesta fue proporcional a la cantidad de anticuerpo aplicado en pequeña cantidad en el suero sin tratamiento previo. Por el contrario, el anticuerpo policlonal anti-Aldurazyme (BP13), el anticuerpo policlonal anti-rhASB (G192), y el suero sin tratamiento previo no redujeron significativamente la actividad de rhASB.

La incapacidad de un anticuerpo policlonal anti-rhASB (G192) para afectar a la actividad de rhASB, y las diferentes respuestas para múltiples anticuerpos policlonales a la misma concentración, indicaron que el ensayo fue adecuado para detectar anticuerpos neutralizantes, y no refleja la concentración total de anticuerpos. Se seleccionó BP14 (anti-rhASB de conejo) como control en la validación del ensayo, y experimentos de muestras puesto que la respuesta fue la más elevada de los anticuerpos purificados, indicando potencialmente una mayor proporción de anticuerpos monoclonales que inhiben la actividad enzimática.

Establecimiento del punto de corte

Para determinar la señal más baja que se consideraría positiva, se ensayaron 50 sueros sin tratamiento previo para establecer el intervalo de confianza (CI). Los sueros sin tratamiento previo mostraron una distribución bastante amplia con un sesgo negativo. Para estar 90% ciertos de que una reducción fue estadísticamente significativa, se usó la prueba de la t de una cola para establecer la puntuación más alta a 10% (media más 1,282 veces la desviación estándar (SD)). El intervalo de confianza del 95% fue 15% (media más 1,645 veces SD). El intervalo de confianza del 99% fue 25% (media más 2,326 veces SD). Se seleccionó el intervalo de confianza del 90% para el análisis de las muestras.

Sensibilidad

Los experimentos previos han mostrado que el anticuerpo policlonal IgG BP15 purificado mediante afinidad procedente de suero de conejo fue capaz de neutralizar la actividad enzimática de rhASB. La señal procedente de rhASB sin anticuerpo o sin suero que interfiera se consideró 100%. La señal procedente de rhASB incubada con 11,8 µg/ml de BP15 cayó en 54%. Por lo tanto, el ensayo fue capaz de detectar la inhibición de rhASB en las condiciones del tampón alterado.

Se preparó una serie de diluciones de BP14 a 2,5, 5, 7,5, 10, 15 y 20 µg/ml en suero humano reunido sin tratamiento previo, y se comparó con el intervalo de confianza del 95%. BP14 a 7,5 µg/ml o mayor fue capaz de unirse a rhASB e inhibir la actividad de rhASB más allá del 95% de CI. BP14 a 10 µg/ml o mayor fue capaz de inhibir rhASB más allá del 99% de CI. Puesto que sólo una fracción de la población de anticuerpos puede ser capaz de inhibir la actividad enzimática, el LOD se registra de forma más exacta como inferior o igual a aproximadamente 7,5 µg/ml.

Interferencia por fármaco libre

El análisis farmacocinético previo mostró que en pacientes en 24 semanas de terapia de infusión la rhASB en el plasma osciló desde menos de 100 ng/ml en más de 50% de pacientes hasta no más de 663 ng/ml en cualquier paciente en el punto de tiempo de 5 horas. Para evaluar el efecto de fármaco libre, se preparó anti-rhASB 10-150 µg/ml en suero sin tratamiento previo que contiene 0-1000 ng/ml de rhASB. Si se retiene rhASB libre en las muestras séricas durante la etapa de purificación de los anticuerpos, entonces podría dar como resultado una mayor señal en el ensayo de actividad, y enmascarar cualquier reducción debida a anticuerpos. Para cada concentración de rhASB, se calculó la exactitud relativa frente a 0 ng/ml de rhASB.

A 10 ng/ml de rhASB, la exactitud relativa fue 82-109%, sin una fuerte desviación. A 100 ng/ml de rhASB, la exactitud relativa fue 47-76%, indicando que, a esta concentración de rhASB, la cantidad de proteína retenida durante la etapa de purificación de anticuerpos sí interfirió con la detección de anticuerpos neutralizantes. Puesto que concentraciones de rhASB por encima de 10 ng/ml son improbables siete días después de la infusión, la etapa de aislamiento de anticuerpos es suficientemente robusta para la interferencia de fármacos libres.

Interferencia por la matriz

Para evaluar el efecto de la matriz (por ejemplo, suero) en la relación de respuesta de anticuerpo-actividad, se preparó el suero usando el procedimiento de resina de Proteína A/G, y se comparó la actividad de rhASB para esta muestra de suero con la del tampón solo. Debido a que el suero ya había demostrado que interfiere con el ensayo, se evaluó la capacidad de la etapa de preparación de muestras para determinar la eficacia a la hora de eliminar la interferencia. A lo largo de tres experimentos, el suero sin tratamiento previo estaba dentro del 10% del control de tampón, mostrando que la etapa de purificación de anticuerpos elimina efectivamente la interferencia del suero del ensayo de actividad.

La recuperación de anticuerpos se evaluó preparando muestras a 20 µg/ml de anti-rhASB en múltiples sueros sin

tratamiento previo individuales, y estudiando tres alícuotas separadas de cada muestra. El CV en los individuos fue 2-13% para la reducción de la actividad enzimática, y 3-17% para la recuperación de proteína total. El CV entre individuos fue 11% para la reducción de la actividad enzimática, indicando que no se anticipa que la matriz individual provoque variabilidad significativa al evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes.

5 *Precisión*

A fin de determinar la capacidad del ensayo para dar una reducción similar de actividad para anticuerpos en suero a lo largo de múltiples preparaciones de muestras, se hicieron pasar alícuotas separadas de preparaciones de anticuerpos a través de la etapa de purificación mediante Proteína A/G, y se compararon a lo largo de analitos y días. El ensayo mostró una buena reproducibilidad con 5,6-23,4% de CV, con un mayor CV observado próximo al límite de detección. La precisión en el análisis de las muestras proporcionan indicación de su fiabilidad durante el uso normal.

15 *Robustez*

También fue necesario determinar la capacidad del ensayo para permanecer inalterado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en parámetros del procedimiento y proporcionar una indicación de su fiabilidad durante el uso normal.

Una comparación del porcentaje de reducción debido a controles de calidad usando concentraciones de ensayo de rhASB y 4-MUS a 80%, 100%, y 120% de los valores optimizados indicó que la linealidad del ensayo no se vio afectada por variaciones de 20% en las concentraciones de 4-MUS y rhASB. El cambio en la concentración de rhASB dio como resultado un incremento o disminución correspondiente en el % de actividad, como se esperaba. Variando la concentración de 4-MUS desde 4 mM hasta 6 mM, se afectaron los resultados ligeramente, permaneciendo los valores dentro del 10% del valor para 5 mM de 4-MUS a la misma concentración de rhASB. Adicionalmente, la muestra preparada produjo resultados similares desde 0-4 días después del procesamiento con la resina de Proteína A/G. Estos resultados demuestran la robustez del ensayo y la capacidad para soportar cambios menores en variables de ensayo.

Los tiempos de las dos etapas de incubación de anticuerpos oscilaron desde 30-65 minutos para la incubación de suero, desde 5-20 minutos para la elución de glicina, y desde 40-65 minutos para la preincubación de anticuerpo purificado con rhASB. Basándose en estos resultados, se recomiendan para este ensayo ventanas de 60-70 min., 10-15 min., y 60-70 min., respectivamente.

Se establecieron varios intervalos de robustez para este ensayo. El intervalo aceptable de temperatura fue 36-38°C. El tiempo de incubación fue robusto desde 19-21 minutos. También se encontró que las fechas de caducidad de los reactivos son fiables para 1 mes para el tampón de ensayo de actividad, 2 meses para el tampón de parada, y 1 año para 4-MUS.

40 *Estabilidad de las muestras*

Para evaluar la estabilidad de muestras de anticuerpos frente a diferentes condiciones de almacenamiento, los controles se sometieron a múltiples ciclos de congelación-descongelación, múltiples días de almacenamiento a 4°C, y múltiples días de almacenamiento a 4°C para el eluato de anticuerpos. Para anti-rhASB, la estabilidad de las muestras se estableció a lo largo de 5 ciclos de congelación-descongelación y 4 días de almacenamiento a 4°C para suero puro. El almacenamiento del eluato de anticuerpos tuvo una mala exactitud, y no se recomienda para la implementación del ensayo.

50 **Ejemplo 4**

MEDICIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-ENZIMA QUE INTERFIEREN CON LA UNIÓN DE ENZIMA/RECEPTOR

A fin de que la terapia con enzimas lisosómicas (LE) tenga éxito, la LE debe ser captada en las células y dirigida al lisosoma. El mecanismo de captación es principalmente a través de la unión de restos de manosa-6-fosfato en la LE al Receptor de Manosa-6-Fosfato Independiente del Calcio (CIMPR). Se ha determinado que la unión a este receptor es necesaria y suficiente para la captación (Dintzis *et al.*, J Biol Chem 269:12159-66 (1994)). Por lo tanto, el uso de un ensayo para evaluar la neutralización de la unión de CIMPR se puede usar como un sustituto para la neutralización de la captación mediada por el receptor.

Para evaluar la presencia de anticuerpos que neutralizan la unión al receptor, se modificó un ensayo de unión a sCIMPR a base de placas que había sido desarrollado previamente en BioMarin para la caracterización de rhASB purificada. El ensayo original usó la actividad de rhASB para cuantificar la cantidad de rhASB presente. Puesto que el fin es distinguir entre los dos modos potenciales de neutralización, *es decir*, actividad y unión, la actividad enzimática no es el procedimiento de detección preferido para la adaptación a un ensayo de anticuerpos neutralizantes. Para producir un ensayo para detectar anticuerpos neutralizantes, se usó rhASB marcada con

biotina.

Purificación de sCIMPR

- 5 El dominio extracelular soluble del CIMPR (sCIMPR) se purificó a partir de suero fetal bovino usando una columna de afinidad mediante fosfomanano, seguido de la cromatografía de exclusión de tamaños ácida (Valenzano *et al.*, Analytical Biochemistry 209:156-162 (1993)). El dominio extracelular (masa molecular de 250 kDa) comprende aproximadamente 90% de la molécula de CIMPR intacta (masa molecular 275 kDa).

10 *Evaluación de la detección de biotina-rhASB*

- Se preparó biotina-rhASB como se describe en el Ejemplo 1. Para evaluar la capacidad de la detección de biotina-rhASB para sustituir la actividad enzimática, se investigó una serie de muestras con ambos procedimientos de detección. Las muestras incluyeron tampón de bloqueo solo, suero sin tratamiento previo, y una serie de diluciones de un anticuerpo policlonal anti-rhASB que se sabe que inhibe la unión al receptor (BP14 o BP15).

- Para la lectura de la actividad, se evaluó la unión al receptor usando un ensayo de actividad que se llevó a cabo usando el receptor, la enzima, y el sustrato enzimático. Se revistieron placas (96 pocillos, negras, fondo plano) con 4 µg/ml de sCIMPR, y se incubaron a 4°C toda la noche. Las placas se lavaron 2 veces con 200 µl/pocillo, y se incubaron en tampón de bloqueo durante 1 hora a RT. Las muestras se preincubaron 20 minutos con 2 nM de rhASB o 2 nM de biotina-rhASB a RT en un agitador. Las placas se lavaron 2 veces, y las muestras diluidas se añadieron a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a RT. Durante esta incubación, se diluyó el sustrato (5 mM de 4-MUS) 1:2 en tampón de bloqueo, y se equilibró en un baño de agua (37°C durante 30 minutos). Las muestras en las placas se desecharon, las placas se lavaron 2 veces, y el sustrato diluido se añadió a las placas a 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron 20 minutos a 37°C, en un incubador de placas. La reacción se detuvo añadiendo 150 µl/pocillo de tampón de glicina/carbonato. Las placas se leyeron a $\lambda = 366 \text{ nm}$ en $\lambda = 446 \text{ nm}$.

- Para la lectura de biotina-rhASB, se evaluó la unión al receptor usando un ensayo de actividad que se llevó a cabo usando el receptor, la enzima marcada, y un conjugado de estreptavidina-HRP. En el ensayo de unión al receptor, se revistió una placa de fondo plano de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) con 4 µg/ml de sCIMPR, se incubó toda la noche a 4°C, y se lavó dos veces. Se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo, y la placa se incubó durante 1 h a RT (~25°C). El suero que contiene anticuerpos y la rhASB biotinilada (2 nM) se preincubaron durante 30 min. a RT (~25°C). El tampón de bloqueo se eliminó lavando dos veces, y se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de Ab/biotina-rhASB a los pocillos y se incubó a 37°C o RT (con o sin agitación) durante 1 h. La placa se lavó dos veces, y se añadieron 100 µl/pocillo de estreptavidina-HRP a 1:5000 a 37°C durante 30 min. La placa se lavó dos veces y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato TMB, y el color se desarrolló durante aproximadamente 30 min. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2N, y la absorbancia se leyó a 450 nm.

- La presencia del marcador de biotina no interfirió con la unión de rhASB a sCIMPR. Los resultados de la lectura de actividad fueron muy similares para el material marcado y no marcado, indicando que el marcador de biotina no interfiere con la unión de rhASB a sCIMPR.

- Se investigó la correlación entre la lectura de la actividad y la lectura de SA-HRP para biotina-rhASB. La señal generada procedente de la unión de rhASB biotinilada a sCIMPR inmovilizado se consideró 100%. Los resultados del ensayo de unión al receptor y del ensayo de actividad fueron similares para biotina-rhASB, demostrando una comparabilidad entre la actividad basada en el ensayo de unión y el procedimiento de ELISA. Además, los antisueros BP14 y BP15 neutralizaron la interacción entre rhASB y sCIMPR a niveles similares con relación al control para ambos ensayos. Puesto que tanto BP14 como BP15 también inhibieron la actividad enzimática, fueron tolerables pequeñas diferencias en las dos lecturas. Los sueros previamente extraídos por sangrado no afectaron a ninguna lectura de ensayo.

Establecimiento del punto de corte

- Para determinar la señal más baja que se consideraría positiva, se ensayaron 50 sueros sin tratamiento previo para establecer un intervalo de confianza (CI) de 95% para la reducción de señal con relación al suero reunido sin tratamiento previo. Para estar seguros al 95% de que una reducción fue estadísticamente significativa, se usó la prueba de la t de una cola para ajustar el punto de corte a 8,5% (1,645 veces la desviación estándar (SD)). El intervalo de confianza del 99% también se calculó a 11,5% (2,326 veces SD).

60 *Especificidad*

- La especificidad del ensayo se evaluó usando anti-rhIDU (BP13) incubado de la misma manera que el suero de muestra. Anti-rhIDU no alteró significativamente la unión rhASB-sCIMPR a las mismas diluciones que los antisueros o a una cantidad hasta 125 µg/ml salpicada en sueros sin tratamiento previo.

65

Límite de detección

Para establecer la dilución más baja de anticuerpo que puede neutralizar la unión rhASB/sCIMPR más del punto de corte, se aplicó G192 purificada en suero humano sin tratamiento previo en series de diluciones a 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 µg/ml. Aunque 35 µg/ml fue capaz de reducir la unión más del punto de corte de 8,5%, la variabilidad fue muy elevada. La concentración más baja que fue capaz de reducir la unión con precisión aceptable fue 45 µg/ml. Puesto que sólo una fracción de la población de anticuerpos puede ser capaz de inhibir la actividad enzimática, el LOD se registra más exactamente como inferior o igual a aproximadamente 45 µg/ml.

Aunque el LOD es elevado, se anticipa que la inhibición de la unión de rhASB a sCIMPR requiere múltiples interacciones de anticuerpos, puesto que cada molécula de rhASB contiene múltiples sitios de glucosilación de manosa-6-fosfato que pueden mediar la unión al receptor. Debido a este requisito, se pueden necesitar concentraciones mayores de múltiples anticuerpos capaces de bloquear la unión a través de un resto individual de manosa-6-fosfato para que tenga un efecto funcional.

Concentraciones bajas de anticuerpos dieron como resultado una reducción negativa del porcentaje, que fue estadísticamente significativa a partir de los 50 individuos sin tratamiento previo. Esta mejora *in vitro* de la unión al receptor puede indicar que algunos clones de los anticuerpos pueden potenciar realmente la unión de rhASB a sCIMPR *in vivo*. Con el fin de identificar anticuerpos neutralizantes, se considera que cualesquiera muestras de reducción negativa del porcentaje están por debajo del LOD para el ensayo.

Interferencia por fármaco libre

El análisis farmacocinético previo mostró que en pacientes en las 24 semanas de terapia de infusión mostraron que la rhASB en el plasma osciló desde menos de 100 ng/ml en más de 50% de los pacientes hasta no más de 663 ng/ml en cualquier paciente en el punto de tiempo de 5 horas. rhASB libre en las muestras de suero podría inhibir la unión de biotina-rhASB compitiendo por los sitios de unión en sCIMPR. Para examinar la capacidad de rhASB libre para disminuir la inhibición de la unión mediada por anticuerpos, se incubaron cantidades crecientes de rhASB (10, 50, y 100 ng/ml) con concentraciones bajas (10 µg/ml), intermedias (50 µg/ml), y elevadas (100 µg/ml) de BP14 en 10% de suero, y se comparó con la unión en condiciones estándar. Para cada concentración de rhASB, se calculó la exactitud relativa frente a 0 ng/ml de rhASB.

Cuando los niveles de rhASB fueron mayores que 10 ng/ml, la relación de concentración-respuesta falló a la hora de cumplir los criterios de aceptación de exactitud entre las muestras con y sin fármaco libre que interfiere en 75-125%. Por lo tanto, el nivel de fármaco libre debe permanecer inferior o igual a 10 ng/ml a fin de que el ensayo sea exacto. Puesto que las concentraciones de rhASB por encima de 10 ng/ml son improbables siete días después de la infusión, el ensayo es suficientemente robusto para la interferencia por fármaco libre.

Interferencia por matriz

Para evaluar el efecto de la matriz (por ejemplo, suero) sobre la relación de concentración-respuesta, se diluyó anticuerpo anti-rhASB 10-100 µg/ml en 0-20% de suero humano. Los resultados demostraron que 20% de suero disminuyó la neutralización medida de la unión de rhASB-sCIMPR en 50% o más. A 10% de suero, la señal disminuyó en 2,5-12% con relación al 0% de suero. Por lo tanto, el factor de dilución mínimo recomendado es 10.

Precisión

Se evaluó un conjunto de controles de calidad a 43, 72 y 125 µg/ml de anti-rhASB mediante dos analistas a lo largo de múltiples días. La precisión intra-ensayos se evaluó entre réplicas en una única placa y generó un CV de 1-15%. La precisión inter-ensayos se evaluó como el coeficiente de variación a lo largo de todas las réplicas, y fue 5-7% a lo largo de seis placas separadas.

Robustez

Se examinaron las desviaciones pequeñas en parámetros de ensayo, incluyendo la temperatura de incubación y la concentración de biotina-rhASB, para determinar el efecto sobre el comportamiento del ensayo. Pequeñas desviaciones en los parámetros del procedimiento no deben dar como resultado cambios del ensayo que excedan el 20%, excepto en el LOD, en el que los cambios del ensayo no deben exceder 25%.

Se evaluaron tiempos de incubación desde 50-70 minutos para suero y rhASB-biotina, 50-70 minutos para suero/rhASB-biotina con sCIMPR, y 20-40 minutos para SA-HRP, usando 43, 72 y 125 µg/ml de anti-rhASB, y determinando la exactitud relativa con las condiciones estándar. La muestra de 43 µg/ml fue muy sensible a los cambios en los tiempos de incubación, de manera que la recomendación para los tiempos de incubación es para ventanas más estrechas de un total de 10 minutos.

Estabilidad de las muestras

Para evaluar la estabilidad de muestras de anticuerpos a diferentes condiciones de almacenamiento, los controles se sometieron a múltiples ciclos de congelación-descongelación. Para anti-rhASB, la estabilidad de las muestras se estableció a lo largo de 3 ciclos de congelación-descongelación.

Ejemplo 5**MEDICIÓN DE ANTICUERPOS DE ISOTIPO IgE ANTI-rhASB**

Se desarrolló un inmunoensayo inverso (ELISA de IgE anti-rhASB) para uso en la detección de la presencia de anticuerpos IgE específicos de rhASB en suero humano, con relación al intervalo de respuestas mostradas por muestras de suero procedentes de una población humana sin tratamiento previo. El ensayo implica la unión de anticuerpo anti-IgE humana a una placa de múltiples pocillos de ELISA, la unión de una muestra de suero al anticuerpo IgE, y la detección mediante rhASB biotinilada y conjugado de estreptavidina-HRP.

Punto de corte

Para identificar la concentración más baja de analito que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar, en el control del ensayo, se establecieron intervalos de fondo de IgE de valor inicial ensayando un panel de suero humano sin tratamiento previo (50 muestras). La distribución de señales para sueros individuales sin tratamiento previo se determinó para 50 muestras de suero humano. Se calculó la diferencia con relación a un lote reunido, en cada placa de ensayo. La media y la desviación estándar se calcularon a partir de las señales individuales. Se calculó el intervalo de confianza del 95% como $0,030 (1,645 \times SD)$. El intervalo de confianza del 95% se usó como un factor de punto de corte, que entonces se añadió a la media del conjunto de suero sin tratamiento previo en cada placa de ensayo para obtener el punto de corte de la placa. El uso de un CI de 95% conducirá a aproximadamente una tasa de falsos positivos de 5% (intervalo de confianza de 95%). Entre las 50 muestras de suero humano sin tratamiento previo, 3 tuvieron valores de absorbancia mayores que el punto de corte, produciendo una tasa de falsos positivos del 6%.

Límite de detección

El LOD fue la concentración de analito para la cual la respuesta media medida es superior a la media procedente del suero humano sin tratamiento previo reunido más el factor de punto de corte. Puesto que no había disponible ningún anti-rhASB de IgE humana, el límite de detección se estimó usando 0,41-300 ng/ml de anticuerpo IgG de conejo anti-rhASB, y un anticuerpo de captura alterno. Las concentraciones a o por debajo de 0,41 ng/ml estuvieron por debajo del punto de corte de la placa. Por lo tanto, para este ensayo, el LOD se puede considerar aproximadamente 1,23 ng/ml.

Selectividad y especificidad

Para ensayar la especificidad de la detección de IgE anti-rhASB, se examinaron varios parámetros durante la validación. Para confirmar que la señal fue debida a anticuerpos específicos de rhASB, se añadió rhASB sin marcar durante la incubación con biotina-rhASB, para demostrar la competición específica de rhASB por anti-rhASB IgG de conejo. Con la adición de 2000 ng/ml, se observaron inhibiciones de 64,6% y 52,1% para los controles anti-rhASB de 20 y 50 ng/ml, respectivamente. Adicionalmente, 50 ng/ml de anticuerpo anti-rhIDU de conejo dio una señal significativamente por debajo del LOD, con una absorbancia virtualmente igual al nivel de fondo del tampón.

Estos resultados indicaron que el ensayo fue específico para anticuerpos anti-rhASB.

Interferencia procedente de fármaco libre

Puesto que las muestras de IgE se pudieron recoger potencialmente de forma inmediata después de una reacción de hipersensibilidad, existe la posibilidad de que pueden estar presentes a partir de la infusión niveles significativos de rhASB.

Para evaluar el efecto de fármaco libre sobre la relación de concentración-respuesta, se ensayó una combinación de rhASB sin marcar e IgG anti-rhASB crecientes. Se usaron rhASB (2, 20 y 200 ng/ml) y anti-rhASB (2, 5, 20 y 100 ng/ml), y se determinó el efecto de fármaco libre y la exactitud del anticuerpo. Se prepararon mezclas en tubos de racimos, y se incubaron durante 1 hora a RT con agitación suave antes de cargar sobre la placa de ensayo.

Se observaron niveles diferentes de inhibición con la adición de rhASB a IgG anti-rhASB de conejo en el ensayo. Esta inhibición, reflejada por la reducción del porcentaje de exactitud, se correlaciona con la concentración de rhASB añadida y con la concentración de IgG anti-rhASB de conejo. En presencia de 2 ng/ml de rhASB (nivel sérico de 100 ng/ml después de ajustar con un factor de dilución de 50), la exactitud entre las muestras con y sin el fármaco libre que interfiere fue 83,2-98,0%. La exactitud cayó más allá del intervalo aceptable de 80-120% con 20 ó

200 ng/ml de rhASB presente. A los tres niveles de rhASB ensayados, el porcentaje de exactitud cayó más abajo al aumentar el nivel de concentración de IgG anti-rhASB, sugiriendo que la inhibición de rhASB para este formato de ensayo es mayoritariamente debida a rhASB unida a los anticuerpos anti-rhASB en las muestras de suero.

5 *Interferencia de la matriz*

Para evaluar el efecto de suero sobre la relación de concentración-respuesta, se evaluó el efecto de 1%, 2%, y 10% de suero humano sobre la exactitud de los patrones de anti-rhASB IgG de conejo.

- 10 Dentro del intervalo lineal de la curva (1,2 ng/ml a 100 ng/ml), la exactitud entre las muestras con cantidades crecientes de suero que interfiere (1%, 2%, y 10%) estaba dentro de 80-103%. Una matriz de dos por ciento de suero proporcionó el intervalo lineal más amplio con exactitud aceptable, de manera que el factor de dilución recomendado durante el análisis de las muestras es 50.

15 *Interferencia de IgG*

- 20 Para identificar un anticuerpo de captura apropiado, se revistieron curvas de IgG humana e IgE humana en una placa, y se detectaron con diversos anti-IgE humana directamente marcada con biotina o HRP. El anticuerpo seleccionado para el desarrollo del ensayo tuvo una señal más baja para 300 ng/ml de IgG que para 0,41 ng/ml de IgE. Esta diferencia de aproximadamente 730 veces asegurará que la IgE total es capturada preferentemente con respecto a la IgG total. Cierta IgG puede ser capturada, pero los anticuerpos IgG que se unirán específicamente a la rhASB detectable sólo serán una fracción de la IgG capturada inadvertidamente.

- 25 Para evaluar la interferencia de otros isotipos de anticuerpos, se incubó anticuerpo de cabra anti-IgE humana con patrones de IgE, patrones de IgG, o muestras que contienen concentraciones equimolares de IgE e IgG. La presencia de IgG no interfirió con la medida de IgE en un formato de IgE total. También, los patrones de IgG no produjeron ninguna señal significativamente por encima del nivel de fondo del tampón, como se observó con los patrones de IgE.

- 30 Para determinar si el ensayo fue específico para IgE, y la relación de concentración-respuesta para IgE no se vio afectada significativamente por IgG presente en las muestras, se añadió a los patrones de IgE una cantidad igual de IgG. Este parámetro se ensayó en el formato de revestimiento con anti-IgE humana. Se preparó una curva de calibración de IgE humana que oscila desde 0,07 hasta 50 ng/ml con y sin IgG humana, y se analizó en el formato de IgE humana total. Dentro del intervalo lineal de la curva de IgE total (0,21 ng/ml a 16,7 ng/ml), la exactitud entre las muestras con y sin la IgG anti-rhASB que interfiere estaba dentro de 88,4-106,5%, no mostrando interferencia de IgG.

Precisión

- 40 Las precisiones intra- e inter-ensayos se examinaron estudiando concentraciones bajas (0,4 ng/ml), intermedias (3 ng/ml), y elevadas (20 ng/ml) de anti-rhASB de IgG de conejo. La precisión intra-ensayo se calculó como el porcentaje de CV de las muestras triplicadas, y estaba dentro del 1-5% a lo largo de las seis placas. La precisión inter-ensayos se calculó como el % de CV para los valores medios para las seis placas, y estaba dentro de 2-11%, con mayor % de CV para menores concentraciones.

45 *Robustez*

- 50 Los ensayos de robustez indican que el ensayo puede medir exactamente hasta 10% de cambios en la concentración estándar, y el efecto de múltiples congelaciones y descongelaciones de las muestras no afecta al resultado del ensayo.

- 55 Se examinaron pequeñas variaciones en los parámetros del ensayo, incluyendo temperatura de incubación y concentración de reactivos de detección, para determinar el efecto del comportamiento del ensayo. Los tiempos de incubación se examinaron a 90, 100, y 110% de los tiempos optimizados (10 min. para el desarrollo de TMB, 60 min. para todas las otras etapas), y las concentraciones se examinaron a 90, 100, y 110% de las concentraciones establecidas. Para evaluar el efecto sobre el comportamiento del ensayo, se estudiaron 0,07-16,7 ng/ml de anti-rhASB de IgG de conejo, y se determinó la exactitud del retrocálculo a una curva estándar. Para todas las condiciones ensayadas, la exactitud estaba en 85-110% para valores por encima del límite de detección.

60 *Estabilidad de las muestras*

- 65 Para evaluar la estabilidad de muestras de anticuerpos frente a diferentes condiciones de almacenamiento, las muestras se sometieron a múltiples ciclos de congelación-descongelación. Para IgG de conejo anti-rhASB, la estabilidad de las muestras se estableció a lo largo de 3 ciclos de congelación-descongelación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar anticuerpos específicos de enzimas lisosómicas (LE) en un ser humano, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal procedente del ser humano con una primera enzima lisosómica marcada con un resto de captura, y una segunda enzima lisosómica marcada con un resto de detección, para formar un complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica,
 - (b) capturar el complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica procedente de la etapa (a) poniendo en contacto el complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica con un soporte sólido que se une específicamente al resto de captura, y
 - (c) detectar la presencia de anticuerpo específico de LE capturado procedente de la muestra de fluido corporal detectando la presencia de la segunda enzima lisosómica marcada con el resto de detección.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el resto de captura de la primera enzima lisosómica está unido al soporte sólido a través de una interacción no covalente.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fluido corporal, la primera enzima lisosómica y la segunda enzima lisosómica se ponen en contacto juntos durante por lo menos aproximadamente 30 minutos antes de la etapa (b).
4. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración molar de la primera enzima lisosómica es aproximadamente la misma o inferior a la concentración molar de la segunda enzima lisosómica.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el límite de detección es
 - (a) inferior a aproximadamente 500 ng/ml; o
 - (b) inferior a aproximadamente 100 ng/ml.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el límite de detección es de aproximadamente 1,7 ng/ml a aproximadamente 8,5 ng/ml.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la primera y la segunda enzimas lisosómicas
 - (a) son ambas arilsulfatasa humana recombinante (rhASB); o
 - (b) son ambas α -glucosidasa humana recombinante (rhGAA).
8. Procedimiento para detectar anticuerpos específicos de enzimas lisosómicas (LE) en un ser humano, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) capturar anticuerpo específico de LE en una muestra de fluido corporal procedente del ser humano poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con una primera enzima lisosómica unida a un soporte sólido,
 - (b) poner en contacto anticuerpo específico de LE capturado procedente de la etapa (a) con una segunda enzima lisosómica marcada con un resto de detección, y
 - (c) detectar la presencia de anticuerpo específico de LE capturado procedente de la muestra de fluido corporal detectando la presencia de la segunda enzima lisosómica marcada con el resto de detección.
9. Procedimiento para detectar anticuerpos que neutralizan a la enzima lisosómica (LE) en un ser humano, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) aislar anticuerpos de iones fosfato y sulfato en una muestra de fluido corporal procedente del ser humano,
 - (b) poner en contacto los anticuerpos aislados procedentes de la etapa (a) con una enzima lisosómica para formar un complejo de anticuerpo específico de LE/enzima lisosómica,
 - (c) añadir un sustrato enzimático, y
 - (d) detectar la cantidad de escisión del sustrato enzimático mediante la enzima lisosómica en presencia y ausencia de los anticuerpos aislados en la muestra de fluido corporal, en el que la escisión reducida en presencia, comparada con la ausencia, de los anticuerpos aislados indica la presencia de anticuerpos que neutralizan la LE en la muestra de fluido corporal.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el límite de detección es inferior o igual a aproximadamente 7,5 µg/ml.
- 5 11. Procedimiento para detectar anticuerpos que inhiben la captación de enzima lisosómica (LE) en un ser humano, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) incubar una muestra de fluido corporal procedente del ser humano con una enzima lisosómica marcada con un resto de detección,
 - 10 (b) poner en contacto la mezcla de incubación procedente de la etapa (a) con un receptor de LE o un fragmento del mismo que se une a LE, estando unido dicho receptor de LE o un fragmento del mismo que se une a LE a un soporte sólido, y
 - 15 (c) detectar la unión de la enzima lisosómica marcada con el resto de detección procedente de la etapa (a) al receptor de LE o al fragmento del mismo que se une a LE, en el que una unión reducida en presencia de la muestra de fluido corporal indica que la muestra de fluido corporal contiene un anticuerpo que inhibe la captación de LE.
- 20 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el receptor de LE o un fragmento del mismo que se une a LE está unido al soporte sólido a través de una interacción no covalente.
- 25 13. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la etapa de incubación (a) se lleva a cabo durante por lo menos aproximadamente 30 minutos, y/o la etapa de puesta en contacto (b) se lleva a cabo durante por lo menos aproximadamente 1 hora.
- 30 14. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la LE es arilsulfatasa humana recombinante (rhASB), y el receptor de la LE es CIMPR o un fragmento del mismo que se une a rhASB.
- 35 15. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el límite de detección es inferior o igual a aproximadamente 45 µg/ml.
- 40 16. Procedimiento para detectar anticuerpos de isotipo IgE específicos de la enzima lisosómica (LE) en un ser humano, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) capturar IgE en una muestra de fluido corporal procedente del ser humano poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con anticuerpo específico de IgE unido a un soporte sólido,
 - (b) poner en contacto la IgE capturada procedente de la etapa (a) con una enzima lisosómica marcada con un resto de detección, y
 - 45 (c) detectar la cantidad de anticuerpo de isotipo IgE específico de LE en la muestra de fluido corporal detectando la cantidad de enzima lisosómica marcada con el resto de detección.
- 50 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo específico de IgE está unido al soporte sólido a través de una interacción no covalente.
- 55 18. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo específico de IgE no muestra reactividad cruzada detectable con IgG cuando IgG está presente en una concentración por lo menos aproximadamente 730 veces superior a IgE.
19. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el límite de detección es aproximadamente 1,23 ng/ml de IgE humana.
20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 8, 9, 11 ó 16, en el que el fluido corporal es suero.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 11 ó 16, en el que la LE es arilsulfatasa humana recombinante (rhASB).