

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 876**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 07802195 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2067044**

54 Título: **Ensayo de anticuerpo antifármaco**

30 Prioridad:

12.09.2006 EP 06019016

04.10.2006 EP 06020797

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

12.11.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**ESSIG, ULRICH;
STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR;
VOGEL, RUDOLF y
WESSELS, UWE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 428 876 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

Ensayo de anticuerpo antifármaco

5 La invención comprende un método para la determinación de anticuerpos antifármaco.

Antecedentes de la invención

10 Los inmunoensayos de fase sólida estándares con anticuerpos monoclonales implican la formación de un complejo entre un anticuerpo adsorbido sobre una fase sólida (anticuerpo de captura), un antígeno y un anticuerpo de otro epítipo del antígeno conjugado con un enzima o con un marcaje detectable (anticuerpo trazador). De esta manera se forma un sándwich: fase sólida-anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo trazador. En el sándwich, la actividad del enzima conjugado a anticuerpo (o la cantidad de marcaje detectable) es proporcional a la concentración de antígeno en el medio de incubación. Un ensayo de tipo sándwich es el inmunoensayo de puente de doble antígeno, en el que los anticuerpos de captura y trazados se unen a diferentes epítipos del antígeno. Hoesel W. *et al.*, J. Immunol. Methods 294:101-110, 294, informan de un ensayo de puente de doble antígeno anti-EPO en el que se utiliza una mezcla de rhEPO inmovilizado acoplado a grupos aminos y a grupos carbohidratos. Los inmunoensayos tales como el ELISA de puente de doble antígeno son tipos de ensayo comunes en la investigación de una respuesta inmunogénica de un paciente a un fármaco de anticuerpo. Mire-Sluis A.R. *et al.*, J. Immunol. Methods 289:1-16, 2004, resumen las recomendaciones para el diseño y optimización de los inmunoensayos utilizando la detección de anticuerpos del huésped contra productos biotecnológicos. Según Mire-Sluis *et al.*, los bien conocidos formatos de ensayo de anticuerpo anti-fármaco presentan considerables desventajas. Los ensayos de anticuerpo antifármaco se mencionan, por ejemplo, en los documentos WO nº 2005/045058 y nº 90/006515. Los ensayos de anticuerpo antiidiotípico se mencionan, por ejemplo, en la patente US nº 5.219.730, documento WO nº 87/002778, y patentes EP nº 0 139 389 y nº 0 170 302. Wadhwa M. *et al.*, J. Immunol. Methods 278:1-17, 2003, informan de estrategias para la detección, medición y caracterización de anticuerpos no deseados inducidos por productos biológicos terapéuticos. Un ensayo inmunológico para la determinación inmunológica de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármaco en una muestra utilizando un inmunoensayo de puente de doble antígeno se describe en el documento PCT nº EP2007/001935. Un ensayo inmunológico para la determinación de anticuerpos humanos en monos se describe en el documento WO nº 2006/066912. En la técnica (por ejemplo documento US nº 2003/0068664), también son conocidos sistemas de ensayo que permiten la detección de anticuerpos terapéuticos activos. Dichos sistemas requieren la unión del antígeno a una fase sólida, la unión del anticuerpo terapéutico a dicho antígeno unido y la detección del anticuerpo terapéutico unido mediante el antígeno a la fase sólida.

35 Bourdage J.S. *et al.* (J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 39:685-690, 2005) informan del efecto del formato del inmunoensayo de puente de doble antígeno sobre la dependencia de la concentración de recubrimiento de antígeno y las implicaciones para el diseño de ensayos de inmunogenicidad para anticuerpos monoclonales.

Descripción resumida de la invención

40 La invención proporciona un método para la determinación inmunológica de un complejo inmunológico (complejo DA/ADA) de un anticuerpo de fármaco (AF) humano o humanizado y un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármaco (anticuerpo antifármaco, AAF) en una muestra de una especie de mono seleccionada de entre Cynomolgus, Rhesus y babuino utilizando un ensayo de tipo sándwich, que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, caracterizado porque uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo de unión específica a IgG de Cynomolgus y que no se une a IgG humana y el otro anticuerpo es un anticuerpo de unión específica a inmunoglobulina humana y que no se une a IgG de Cynomolgus y porque la muestra se preincuba con una cantidad predeterminada de dicho anticuerpo de fármaco.

50 El complejo inmunológico se abrevia adicionalmente como complejo AF/AAF.

En una realización preferente de la invención, el anticuerpo de captura es un anticuerpo que se une específicamente a IgG humana y el anticuerpo trazador es un anticuerpo que se une específicamente a IgG de Cynomolgus y que no se une a inmunoglobulina humana. En una realización preferente de la invención, el anticuerpo de captura es un anticuerpo que se une específicamente a IgG de Cynomolgus y que no se une a inmunoglobulina humana y el anticuerpo trazador es un anticuerpo que se une específicamente a IgG humana.

60 El anticuerpo anti-Ig humana se une específicamente a IgG humana. Preferentemente, el anticuerpo anti-IgG de Cynomolgus y/o el anticuerpo anti-Ig humana es/son monoclonales. Dicho anticuerpo de unión específica a inmunoglobulina humana no se une a IgG de Cynomolgus. Preferentemente, dicho anticuerpo de unión a inmunoglobulina humana es producido por la línea celular DSM ACC2708. Dicho anticuerpo de unión a IgG de Cynomolgus no se une a IgG humana. Preferentemente dicho anticuerpo de unión a IgG de Cynomolgus es producido por la línea celular 3.25.12 (DSM nº ACC2799), 3.29.15 (DSM nº ACC2800), 4.38.30 (DSM nº ACC2801), 7.57.41 (DSM nº ACC2802) ó 7.72.32 (DSM nº ACC2803).

65

Durante el curso de dicha determinación se forma un complejo entre el anticuerpo anti-IgG de *Cynomolgus*, el complejo AF/AAF y el anticuerpo anti-IgG humano y la cantidad de complejo formada se correlaciona con la concentración de complejo AF/AAF, AF y/o AAF.

5 Según la invención, se lleva a cabo un análisis de muestras tras la preincubación con una cantidad predeterminada del anticuerpo de fármaco. En dicho ensayo se observan señales positivas en el caso de que la muestra contenga anticuerpos antifármaco independientes de la presencia/ausencia de anticuerpos de fármaco en la muestra.

10 Preferentemente, el anticuerpo de captura se conjuga con la fase sólida mediante adsorción pasiva y, por lo tanto, se conjuga con la fase sólida en por lo menos dos sitios de anticuerpo diferentes. La adsorción pasiva se describe en, por ejemplo, Butler J.E., *Solid Phases in Immunoassay*, en: *Immunoassays*, Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores), Academic Press San Diego, 1996, páginas 205-225.

15 En una realización preferente de la invención, el anticuerpo de captura se inmoviliza mediante una pareja de unión específica. Dicha pareja de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (ver, por ejemplo, Hermanson G.T. *et al.*, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996), lectina/polisacárido, esteroide/proteína de unión a esteroide, hormona/receptor de hormona, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G, etc. Preferentemente, el anticuerpo de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se lleva a cabo mediante avidina o estreptavidina inmovilizada.

20 Preferentemente, la conjugación del anticuerpo con su pareja de conjugación se lleva a cabo mediante unión química mediante grupos N-terminales y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólico del esqueleto de aminoácidos del anticuerpo y/o grupos de alcohol de sacárido de la estructura carbohidrato del anticuerpo.

25 En una realización preferente de la invención, el anticuerpo trazador se conjuga con un marcaje detectable, preferentemente se conjuga mediante una pareja de unión específica. Dicha pareja de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno, lectina/polisacárido, esteroide/proteína de unión a esteroide, hormona/receptor de hormona, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G, etc. Preferentemente, el anticuerpo trazador se conjuga mediante digoxigenina y un anticuerpo contra digoxigenina con el marcaje detectable. Alternativamente, el anticuerpo trazador se conjuga con un marcaje electroquimioluminiscente, tal como un complejo de rutenio-bispiridilo. En una realización preferente de la invención, el anticuerpo trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcaje detectable se lleva a cabo mediante un anticuerpo contra la digoxigenina.

35 Descripción detallada de la invención

40 La expresión "anticuerpo de fármaco" según la invención se refiere a un anticuerpo que puede administrarse en un individuo para el tratamiento de una enfermedad. En un ensayo llevado a cabo según la invención, el anticuerpo de fármaco y el anticuerpo de captura, o el anticuerpo de fármaco y el anticuerpo trazador, respectivamente comprenden "la misma" molécula de anticuerpo, por ejemplo producida recombinantemente con el mismo vector de expresión y que comprende la misma secuencia de aminoácidos. Los anticuerpos de fármaco (anticuerpos monoclonales terapéuticos) se están utilizando ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo neoplasias hematológicas y sólidas, entre ellas el linfoma no de Hodgkin, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal), enfermedades inmunológicas, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades vasculares o enfermedades infecciosas. Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en Levene A.P. *et al.*, *Journal of the Royal Society of Medicine* 98:145-152, 2005. Dichos anticuerpos son, por ejemplo, anticuerpos contra CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Lewis-Y, receptor de IL-6 ó receptor de IGF-1. También se describen anticuerpos terapéuticos en Groner B. *et al.*, *Curr. Mol. Meth.* 4:539-547, 2004; Harris M., *Lancet Oncol.* 5:292-302, 2004.

50 Un ejemplo (preferentemente monoclonal) de anticuerpo de fármaco terapéutico es un anticuerpo contra el receptor de IL-6 (mAb IL6R). Dicho anticuerpo se describe en, por ejemplo, Mihara M. *et al.*, *Clin. Immunol.* 98:319-326, 2001; Nishimoto N. *et al.*, *Blood* 106:2627-2632, 2005, en el ensayo clínico nº NCT00046774, en el documento WO nº 2004/096274.

55 Un ejemplo (preferentemente monoclonal) de anticuerpo de fármaco terapéutico es un anticuerpo contra el receptor de IGF-1 (mAb IGF-1R). Dicho anticuerpo se describe en, por ejemplo, los documentos WO nº 2004/087756 y nº 2005/005635.

60 Los "anticuerpos antifármaco" son anticuerpos que pueden presentar como diana cualquier región del anticuerpo de fármaco, tal como, por ejemplo, el dominio variable, los dominios constantes o la glucoestructura del anticuerpo de fármaco. Dichos anticuerpos antifármaco pueden aparecer durante la terapia de anticuerpo como reacción inmunogénica de un paciente (ver Pan Y. *et al.*, *FASEB J.* 9:43-49, 1995). La mayoría de los "anticuerpos antifármaco" se unen a una o más de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de fármaco.

65

La afinidad de los anticuerpos antifármaco para su antígeno de anticuerpo de fármaco es en general más baja que la afinidad del anticuerpo de fármaco para su antígeno diana.

5 Un "anticuerpo anti-IgG de Cynomolgus" es un anticuerpo, preferentemente monoclonal (es decir, un anticuerpo anti-Cynomolgus monoclonal, mAb<IgG Cyno>) que se une específicamente a IgG de Cynomolgus (inmunoglobulina G de Cynomolgus). Dicho anticuerpo se une a una IgG de Cynomolgus con una constante de disociación ($=K_{Dis}$) de por lo menos 10^{-9} moles/l, más preferentemente con una K_{Dis} de por lo menos 10^{-10} moles/l. Simultáneamente, la propiedad de no unirse a la IgG humana está garantizada por una K_{Dis} de 10^{-8} moles/l o peor, por ejemplo de 10^{-5} moles/l. También preferentemente, el anticuerpo de unión a IgG de Cynomolgus y que no se une a la IgG humana presentará una diferencia de por lo menos 100 veces entre su reactividad hacia la IgG de Cynomolgus y hacia la IgG humana, respectivamente.

15 Preferentemente, el anticuerpo anti-IgG de Cynomolgus se une también a IgG de tití común, IgG de mono Rhesus e IgG de babuino con una constante de disociación ($=K_{Dis}$) de por lo menos 10^{-8} moles/l, preferentemente de 10^{-9} moles/l, más preferentemente con una K_{Dis} de por lo menos 10^{-10} moles/l.

20 En una realización, el anticuerpo utilizado en la invención es un anticuerpo monoclonal. El término "monoclonal" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una población de anticuerpos producidos por una sola célula o su progenie y también a la unión a un único determinante antigénico de su antígeno diana. La expresión "que no se une a IgG humana" o equivalentes gramaticales de la misma tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un anticuerpo que no muestra unión específica a una IgG humana, es decir, que presenta una K_{Dis} de 10^{-7} moles/l o peor, por ejemplo de 10^{-5} moles/l. Ello no incluye una población policlonal de anticuerpos de Cynomolgus que se ha adsorbido cruzadamente con inmunoglobulinas humanas con el fin de eliminar la unión de la IgG de Cynomolgus a la IgG humana. La adsorción cruzada no sirve para una población de anticuerpos policlonales, y menos de anticuerpos monoclonales, que no se unen a IgG humana debido al equilibrio de unión que se forma en este proceso. Debido a este equilibrio existen varios anticuerpos que se unen a IgG humana que no se encuentran adsorbidos cruzadamente y que quedan en solución y, de esta manera, en la preparación de anticuerpos obtenida. De esta manera, no se elimina por completo de las inmunoglobulinas que se habían adsorbido cruzadamente a IgG humana la unión anti-IgG humana y todavía muestran unión a IgG humana.

30 El término "mono" según la invención se refiere a Cynomolgus, tití común, mono Rhesus y babuino. Preferentemente se refiere a "mono" Cynomolgus, macaco Rhesus y babuino.

35 Preferentemente, el anticuerpo anti-Ig humano (Ig significa inmunoglobulina) es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que no se encuentra presente en la inmunoglobulina de Cynomolgus tal como se indica en el documento WO n° 2006/066912. Este epítipo se caracteriza por su unión mAb<H-Fcypan>M-R10Z8E9, también denominado mAb<h-Fc γ >M-R10Z8E9, o brevemente mAb M-R10Z8E9. En una realización preferente según la presente invención, el anticuerpo anti-Ig humana se caracteriza adicionalmente por la unión al mismo epítipo que mAb M-R10Z8E9. mAb M-R10Z8E9 es producido por la línea celular depositada en DSMZ el 22 de diciembre de 2004 como DSM n° ACC2708. Preferentemente el anticuerpo anti-Ig humana comprende los dominios variables de cadenas pesada y ligera de mAb M-R10Z8E9. Más preferentemente el anticuerpo anti-Ig humana comprende las regiones CDR de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de mAb M-R10Z8E9 y un marco no humano. Preferentemente el anticuerpo anti-Ig humana es un anticuerpo monoclonal (mAb anti-Ig humana).

45 Las propiedades de unión de un anticuerpo, especialmente la K_{Dis} , preferentemente se evalúan mediante un aparato BIAcore®. En este método, las propiedades de unión se evalúan a partir de los cambios en resonancia de plasmón superficial (RPS). Resulta conveniente unir el anticuerpo investigado a la fase sólida (denominada chip) y evaluar la unión de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o incluso de suero que comprende IgG a dicho chip recubierto.

50 Los soportes sólidos para los inmunoensayos según la invención se encuentran ampliamente descritos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Butler J.E., Methods 22:4-23, 2000).

55 Los principios de los diferentes inmunoensayos se describen en, por ejemplo, Hage D.S., Anal. Chem. 71:294R-304R, 1999. Lu B. *et al.*, Analyst. 121:29R-32R, 1996, informand de la inmovilización orientada de anticuerpos para la utilización en inmunoensayos. Se informa de inmunoensayos mediados por avidina-biotina en, por ejemplo, Wilchek M. y Bayer E.A., Methods Enzymol. 184:467-469, 1990.

60 La expresión "inmunoensayo de puente de doble antígeno" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un inmunoensayo de tipo sándwich en el que el antígeno se une a dos anticuerpos diferentes, uniéndose cada uno a un epítipo diferente no solapante o interfiriente del antígeno. En este ensayo, se forma un sándwich que comprende un anticuerpo de captura, el antígeno y un anticuerpo trazador y, de esta manera, el antígeno forma un puente entre dos anticuerpos que se unen a él.

65

Los anticuerpos monoclonales y sus dominios constantes contienen como proteínas varias cadenas laterales reactivas para el acoplamiento con una pareja de unión, tal como una superficie, una proteína, un polímero (por ejemplo PEG), celulosa, o poliestireno, un enzima o un elemento de una pareja de unión. Los grupos químicos reactivos de los anticuerpos son, por ejemplo, grupos amino (grupos ϵ -amino de lisinas, grupos α -amino), grupos tiol (cistinas, cisteínas, metioninas), grupos ácido carboxílico (ácidos aspárticos, ácidos glutámicos) y grupos de sacárido-alcohol. Dichos métodos se describen en, por ejemplo, Aslam M. y Dent A., *Bioconjugation*, MacMillan Ref. Ltd., páginas 50 a 100, 1999.

El término "muestra" incluye cualquier cantidad de una sustancia procedente de un mono. Entre dichas sustancias se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, suero o plasma de dicho individuo, las cuales son las fuentes más ampliamente utilizadas de muestras en la rutina preclínica.

La expresión "fase sólida" se refiere a una sustancia no líquida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y perlas) realizadas en materiales tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas y ferromagnéticas), vidrio o cerámica; sustancias de gel, tales como geles de sílice, alúmina y polímero; capilares, que pueden realizarse en polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; cubetas, tubos u otros recipientes de muestras para espectrómetros. Un componente fase sólida de un ensayo se distingue de las superficies sólidas inertes con las que puede encontrarse en contacto el ensayo en que una "fase sólida" contiene por lo menos una fracción sobre su superficie que se pretende que interactúe con el anticuerpo de captura. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta o placa de microtitulación, o puede ser un componente no estacionario, tal como perlas y micropartículas. También pueden utilizarse micropartículas como fase sólida para formatos de ensayo homogéneos. Puede utilizarse una diversidad de micropartículas que permitan la unión no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Entre dichas partículas se incluyen las partículas de polímero, tal como poliestireno y poli(metilmacrilato), partículas de oro tales como nanopartículas de oro y coloides de oro, y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, vidrio y óxido metálico. Ver, por ejemplo, Martin C.R. *et al.*, *Analytical Chemistry-News & Features* 70:322A-327A, 1998.

Los cromógenos (grupos y pigmentos fluorescentes o luminiscentes), enzimas, grupos o partículas metálicas activas en la RMN, haptenos tales como, por ejemplo, digoxigenina, son ejemplos de marcajes detectables. El marcaje detectable también puede ser un grupo reticulante fotoactivable, por ejemplo un grupo azido o azirina. Los quelatos metálicos que pueden detectarse mediante electroquimioluminiscencia también son grupos preferentes emisores de señales, resultando particularmente preferentes los quelatos de rutenio, por ejemplo un quelato de rutenio (bispíridilo)₃²⁺. Se describen grupos de marcaje de rutenio adecuados en, por ejemplo, la patente EP nº 0 580 979 y documentos WO nº 90/05301, nº 90/11511 y nº 92/14138.

Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones y procedimientos prácticos se resumen en libros de texto relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., *Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates*, en: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Burdon, R.H. y v. Knippenberg, P.H. (editores), Elsevier, Amsterdam, páginas 221-278, 1990, y diversos volúmenes de Colowick S.P. y Caplan N.O. (editores), *"Methods in Enzymology"*, Academic Press, referidos a los métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

Los anticuerpos utilizados en la invención pueden ser producidos por las líneas celulares de hibridoma nº 3.25.12 (DSM nº ACC2799), 3.29.15 (DSM nº ACC2800), 4.38.30 (DSM nº ACC2801), 7.57.41 (DSM nº ACC2802) ó 7.72.32 (DSM nº ACC2803). Pueden encontrarse anticuerpos adicionales útiles en la invención, es decir, de unión específica a IgG de *Cynomolgus* y que no se unen a la IgG humana, por ejemplo utilizando el método descrito de manera general en el Ejemplo 3.

Alternativamente, por ejemplo, puede utilizarse un método en el que en una primera etapa se determine el solapamiento de epítomos de dos anticuerpos de unión al mismo antígeno diana con ayuda de un sistema de ensayo competitivo. Con este fin, por ejemplo con ayuda de un inmunoensayo enzimático, se somete a ensayo el grado en que el anticuerpo en cuestión compite con el anticuerpo conocido para la unión a un antígeno diana inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo producido por las líneas celulares según la invención. Con este fin se incuba con el anticuerpo conocido en forma marcada un antígeno diana apropiadamente inmovilizado y un exceso del anticuerpo en cuestión. Mediante la determinación de la cantidad de anticuerpo unido en forma marcada en presencia y en ausencia del anticuerpo en cuestión puede evaluarse el grado en que el anticuerpo en cuestión puede desplazar el anticuerpo conocido de la unión. En el caso de que se produzca un desplazamiento superior a 20%, preferentemente superior a 30%, a la misma concentración o un desplazamiento superior a 70%, preferentemente superior a 80%, a concentraciones más altas, preferentemente en el caso de un exceso de 10^3 a 10^5 veces del anticuerpo en cuestión, referido al anticuerpo conocido, se produce solapamiento de epítomos y ambos anticuerpos se unen a la misma parte o a una parte solapante del mismo epítomo. Dicho anticuerpo identificado se utiliza en la segunda etapa del método. En ésta se determina la unión del anticuerpo identificado en la etapa uno a la IgG humana. Dicha determinación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un ELISA, un inmunoensayo o mediante resonancia de plasmón superficial. En el caso de que no pueda determinarse unión a IgG humana, dicho anticuerpo

se define como un anticuerpo de unión específica a IgG de Cynomolgus y que no se une a IgG humana. Alternativamente, puede identificarse un anticuerpo utilizado en la invención mediante la determinación de la K_{Dis} hacia la IgG de Cynomolgus y la IgG humana por separado y comparar estos valores.

5 La presente invención informa de un método de determinación inmunológica para la determinación de complejos de anticuerpos de fármaco y anticuerpos antifármaco, que en lo sucesivo se denominan complejos AF/AAF. En mayor
10 detalle, la presente invención comprende un método para la determinación inmunológica de un complejo inmunológico (complejo AF/AAF) de un anticuerpo de fármaco (AF) humano y un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármaco (anticuerpo antifármaco, AAF) en una muestra de una especie de mono utilizando un inmunoensayo de
15 tipo sándwich, que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, en el que uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo de unión específica a IgG de Cynomolgus y que preferentemente no se une a IgG humana y el otro de dichos anticuerpos es un anticuerpo de unión específica a IgG humana y que preferentemente
20 no se une a IgG de Cynomolgus. En una realización, el anticuerpo de captura es un anticuerpo que se une específicamente a IgG humana y que no se une a IgG de Cynomolgus y el anticuerpo trazador es un anticuerpo que se une específicamente a IgG humana y que no se une a IgG de Cynomolgus. En una realización diferente, el anticuerpo de captura es un anticuerpo que se une específicamente a IgG de Cynomolgus y que no se une a IgG humana y el anticuerpo trazador es un anticuerpo que se une específicamente a IgG humana y que no se une a IgG de Cynomolgus. Otra realización de la presente invención es que el anticuerpo que se une específicamente a IgG de Cynomolgus y/o el anticuerpo de unión específica a IgG humana es/son monoclonales.

25 En una realización preferente del presente método la muestra se preincuba con una cantidad predeterminada del anticuerpo de fármaco. Lo anterior permite la detección de anticuerpos antifármaco con independencia de la presencia del anticuerpo de fármaco en la muestra, ya que el presente método es para la detección de complejos AF/AAF (ver, por ejemplo, las figuras 5 y 6).

30 Según la elevada identidad entre los anticuerpos de fármaco humanos o humanizados y las IgG de Cynomolgus, los determinantes antigénicos principales del anticuerpo de fármaco son sus regiones determinantes de complementariedad. Estos determinantes antigénicos preferentemente resultan reconocidos por el anticuerpo antifármaco. De esta manera, la mayoría de los "anticuerpos antifármaco" reconocen, y por lo tanto, se unen a las
35 regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de fármaco correspondiente. La formación del complejo de anticuerpo antifármaco-anticuerpo de fármaco enmascara los epítomos antigénicos y, de esta manera, compete con la determinación de dicho complejo en un ensayo de tipo sándwich.

40 El anticuerpo anti-IgG humana es un anticuerpo de unión específica a un epítomo que no se encuentra presente sobre las inmunoglobulinas obtenidas de un Cynomolgus, tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO nº 2006/066912. En una realización preferente, el anticuerpo anti-IgG humana se caracteriza adicionalmente por la unión al mismo epítomo que el anticuerpo producido por la línea celular DSM nº ACC 2708, que se une a un epítomo que se encuentra presente sobre todas las subclases de inmunoglobulina humana de clase G y aparentemente no se encuentra presente sobre la inmunoglobulina de la mayoría de animales experimentales excepto sobre la IgG de los chimpancés. En una realización preferente adicional, el anticuerpo anti-IgG humana es el anticuerpo producido por la línea celular DSM nº ACC2708.

45 Inesperadamente se ha encontrado que con el método según la invención se evita una detección incompleta del anticuerpo antifármaco. En el caso de que, por ejemplo, la molécula de captura se una al mismo determinante antigénico que el anticuerpo antifármaco, es decir, las CDR del anticuerpo de fármaco, la unión del anticuerpo de fármaco a la molécula de captura bloquearía estos epítomos, es decir, los enmascararía para el anticuerpo antifármaco y de esta manera evitaría que se uniese y fuese detectado el anticuerpo antifármaco. Ello resulta en una
50 detección incompleta de los anticuerpos antifármaco en la muestra. El anticuerpo antifármaco normalmente presente una baja afinidad de unión al anticuerpo de fármaco, requiriendo por lo tanto la colaboración de ambas regiones de unión a antígeno del anticuerpo antifármaco para la unión del anticuerpo de fármaco. De esta manera, no resulta posible la unión a la molécula de captura, conduciendo también a una baja detección del anticuerpo antifármaco. Por lo tanto, la captura mediante las CDR de un anticuerpo antifármaco no resulta adecuada para un ensayo.

55 De esta manera, un aspecto de la presente invención es un método para la determinación inmunológica de un complejo inmunológico (complejo AF/AAF) de un anticuerpo de fármaco (AF) y un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármaco (anticuerpo antifármaco, AAF) en una muestra de una especie de mono utilizando un inmunoensayo de tipo sándwich, que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, en el que uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo de unión específica a IgG de Cynomolgus y que no se une a IgG humana y el otro anticuerpo es un anticuerpo de unión específica a IgG humana y que preferentemente no se une a IgG de Cynomolgus. En una realización de dicho aspecto, el anticuerpo se une específicamente a IgG de Cynomolgus y no se une a IgG humana producida por la línea celular nº DSM ACC2799 ó la nº DSM ACC2800 ó la nº DSM ACC2801 ó la nº DSM ACC2802 ó la nº DSM ACC2803. En otra realización de dicho aspecto, se encuentra el anticuerpo que se une específicamente a la IgG humana y que no se une a la IgG de Cynomolgus producida por la línea celular nº DSM ACC2708.

65

En una realización del presente método, la cantidad de complejo formada se correlaciona con la concentración de complejo AF/AAF, de AF y/o de AAF.

5 En otra realización se encuentra el anticuerpo de captura de unión al anticuerpo antifármaco o al complejo AF/AAF que no se une a las CDR o a la región marco en estrecha proximidad secuencial o geométrica de las CDR del anticuerpo antifármaco.

10 Las líneas celulares de hibridoma preferentes según la invención, 3.25.12, 3.29.15, 4.38.30, 7.57.41 y 7.72.32 se depositaron, bajo el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania:

Clon	nº de depósito	Fecha de depósito
3.25.12	DSM ACC2799	24.08.2006
3.29.15	DSM ACC2800	24.08.2006
4.38.30	DSM ACC2801	24.08.2006
7.57.41	DSM ACC2802	24.08.2006
7.72.32	DSM ACC2803	24.08.2006
MAB M-R10Z8E9	DSM ACC2708	22.12.2004

15 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

20 Figura 1: ensayo de detección de complejos AF/AAF -sin adición de AF.
Se inmovilizaron anticuerpos anti-Ig humana biotinilados en una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (SA-MPT). Los complejos de anticuerpo de fármaco/anticuerpo antifármaco (AF/AAF) fueron capturados por los anticuerpos anti-Ig humana inmovilizados (Bi, biotinilado). El complejo AF/AAF unido se detecta con anticuerpos anti-IgG de Cynomolgus marcados con digoxigenina (Dig, digoxinilado) y conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y peroxidasa de rábano picante (POD) (anticuerpo policlonal anti-DIG conjugado con POD, pAb<Dig>POD). A modo de estándar se utilizó IgG humana conjugada químicamente con IgG de Cynomolgus.

30 Figura 2: ensayo de detección de complejos AF/AAF -sin adición de AF.
Antes del análisis de muestras, se diluyeron muestras de suero de mono en tampón basado en PBS y se añadió anticuerpo de fármaco. Tras preincubar durante 15 minutos, las muestras se analizaron en el ELISA anteriormente indicado (ver la descripción de la figura 1).

35 Figura 3: ensayo de detección de AAF utilizando anticuerpos anti-Cynomolgus.
El anticuerpo de fármaco biotinilado se unió a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (SA-MPT) (Bi: biotinilado). El anticuerpo antifármaco (AAF) se une al anticuerpo de fármaco inmovilizado. El AAF unido se detecta a partir de los anticuerpos anti-IgG de Cynomolgus marcados con digoxigenina (Dig: digoxinilado) y conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y peroxidasa de rábano picante (pAb<Dig>POD). A modo de estándar se utilizó anticuerpo anti-IgG humana conjugado químicamente con IgG de Cynomolgus.

40 Figura 4: curva estándar del ensayo del complejo AF/AAF.
Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de IgG humana conjugada químicamente con IgG de Cynomolgus diluida en tampón basado en PBS con suero al 1% (v/v) de Cynomolgus.

45 Figura 5: detección de complejos AF/AAF en muestras de un estudio PK de dosis únicas en Cynomolgus de HumAb<IGF-1R> (3 mg/kg, i.v.).
Se recogieron muestras de suero en 8 puntos temporales entre 0 h y 1.176 h después de la dosificación de fármaco y se analizaron con el ELISA (mostrado en la figura 1) sin adición de anticuerpo de fármaco. Se proporciona en el gráfico la cantidad de complejos AF/AAF (señal de DO a 405 nm) vs. tiempo tras la dosificación.

50 Figura 6: detección de complejos AF/AAF en muestras de un estudio PK de dosis únicas en Cynomolgus de HumAb<IGF-1R> (3 mg/kg, i.v.).
Se recogieron muestras de suero en 8 puntos temporales entre 0 h y 1.176 h después de la dosificación de fármaco y se analizaron con el ELISA (mostrado en la figura 2) sin adición de anticuerpo de fármaco. Se proporciona en el gráfico la cantidad de complejos AF/AAF (señal de DO a 405 nm) vs. tiempo tras la dosificación.

Figura 7: comparación entre la detección de IgG de Cynomolgus con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus y un anticuerpo policlonal anti-IgG de Cynomolgus

5 Se proporcionan las densidades ópticas (señal (mediana)) para las diversas concentraciones de IgG humana conjugada químicamente con IgG de Cynomolgus diluida en tampón basado en PBS con suero al 1% (v/v) de Cynomolgus.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Preparación de IgG de Cynomolgus y fragmento Fc de Cynomolgus

15 a) Preparación de IgG de Cynomolgus

El suero de Cynomolgus se deslipidó con Aerosil® 380 y se precipitó con sulfato amónico (a 2,0 M). Se homogeneizó el pellet en tampón de fosfato y se dializó frente a tampón de fosfato, pH 7,0. La mezcla se separó mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE a pH 7,0 y la IgG en el eluido se concentró y se purificó mediante filtración en gel.

20 b) Preparación de Fc de Cynomolgus

La IgG purificada de a) se fragmentó con papaína (4 mU de papaína por cada mg de IgG) en presencia de cisteína 15 mM a 37°C a pH 7,0. Tras 80 minutos, la mezcla se incubó con yodoacetamida (a 30 mM) a 25°C y se dializó posteriormente frente a tampón HEPES 10 mM, con NaCl 30 mM, pH 7,5. La mezcla se separó mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose. La fracción Fab se encontraba en el eluido y la fracción Fc se eluyó mediante la utilización de un gradiente salino de cloruro sódico hasta 1 M. Finalmente, la fracción Fc se dializó frente a tampón fosfato y se purificó mediante filtración en gel.

30 Ejemplo 2

Generación de anticuerpos monoclonales anti-IgG de Cynomolgus

35 a) Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones Balb/c o NMRI hembra, respectivamente, de 8 a 12 semanas de edad, principalmente por vía intraperitoneal con 100 mg de IgG de Cynomolgus (inmunoglobulina G de Cynomolgus) o Fc de Cynomolgus mezclado con ACF (adyuvante completo de Freund). Se llevaron a cabo tres etapas adicionales de inmunización intraperitoneal tras 4, 7 y 10 semanas, con la aplicación de 100 mg de IgG de Cynomolgus en cada ratón mezclados con AIF (adyuvante incompleto de Freund). A continuación, se realizaron inmunizaciones intravenosas de refuerzo, cada una con 100 mg de IgG de Cynomolgus en PBS (solución salina tamponada con fosfato, con adición de antihistamínicos y adrenalina) 3 días antes de la fusión.

45 b) Fusión y clonación

La fusión de las células de bazo de los ratones inmunizados según a) con células de mieloma se llevó a cabo según Galfré G. y Milstein C., *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981. Se mezclaron aproximadamente 1×10^8 esplenocitos con aproximadamente 2×10^7 células de mieloma (P3x63-Ag8.653, ATCC nº CRL 1580) y se centrifugaron (10 minutos a 300xg y 4°C). A continuación las células se lavaron una vez con medio de cultivo RPMI 1640 sin SFB (suero de feto bovino) y se centrifugaron nuevamente a 400xg en un vial cónico de 50 ml. A continuación se añadió 1 ml de PEG (polietilenglicol, peso molecular: 4.000 g/mol) y se llevó a cabo la mezcla mediante pipeteado. Tras 1 minuto en un baño de agua a 37°C, se añadieron gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin FCS, se mezcló la suspensión, se llenó hasta 50 ml con RPMI 1640 con FCS al 10% (v/v) y después se centrifugó. Las células sedimentadas se resuspendieron en RPMI 1640 con FCS al 10% y se sembraron en placa en medio de selección con hipoxantina-azaserina (100 mmoles/l de hipoxantina, 1 mg/ml de azaserina en RPMI 1640 con FCS al 10%) que contenía el factor de crecimiento interleuquina-6 (IL-6, 100 U/ml). Tras aproximadamente 10 días, los cultivos primarios se sometieron a ensayo para la síntesis de anticuerpos específicos (ver el Ejemplo 3). Los cultivos primarios que mostraban unión a IgG de Cynomolgus, así como ausencia de reacción cruzada con IgG humana normal, se individualizaron mediante la deposición de células individuales en placas de cultivo celular de 96 pocillos utilizando un citómetro de flujo (FACSAria, BD Biosciences); el medio contenía el factor de crecimiento interleuquina-6 (100 U/ml). Siguiendo este protocolo se generaron los clones depositados (Tabla 1). Las líneas celulares útiles en la presente invención se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania (Tabla 1).

Tabla 1:

clones de mAb anti-Cynomolgus				
Clon	Clase y subclase de IgG	Inmunógeno	nº de depósito	Fecha de depósito
3.25.12	IgG1, kappa	IgG	DSM ACC2799	24.08.2006
3.29.15	IgG1, kappa	IgG	DSM ACC2800	24.08.2006
4.38.30	IgG1, kappa	IgG	DSM ACC2801	24.08.2006
7.57.41	IgG2a, kappa	Fc	DSM ACC2802	24.08.2006
7.72.32	IgG1, kappa	Fc	DSM ACC2803	24.08.2006

c) Producción de inmunoglobulina a partir de sobrenadantes de cultivo celular

5 Las líneas celulares de hibridoma generadas se inocularon a densidades celulares iniciales (células vivas) de entre $1,0 \times 10^5$ y $2,2 \times 10^5$ células por ml (dependiendo de la línea celular individual) en medio RPMI 1640 suplementadas con FCS al 10% y se expandieron en una tecnología de centrifugación durante un periodo de entre 9 y 16 días (dependiendo de la línea celular individual). En los sobrenadantes de cultivo recolectados se alcanzaron concentraciones de entre 36 y 61 mg de anticuerpo monoclonal por ml. La purificación de los anticuerpos a partir de los sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo según métodos químicos estándares para proteínas, por ejemplo según Bruck C. *et al.*, *Methods Enzymol.* 121:587-596, 1986.

Ejemplo 3

15 Ensayos de cribado para la detección de anticuerpos anti-IgG de Cynomolgus

a) Cribado primario para anticuerpos que se unen preferentemente a IgG de Cynomolgus

20 Para la determinación de la especificidad de los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma, se recubrieron MPT (placas de microtitulación) prerrecubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat, Bernried, lote nº MC 1098) con IgG de Cynomolgus biotinilada, 250 ng/ml, o con IgG humana biotinilada, 250 ng/ml, respectivamente, en PBS suplementado con BSA II al 1,0% (p/v) (100 ml en cada pocillo, 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, con agitación), y posteriormente se lavaron 3 veces con NaCl al 0,9% (p/v)/Tween® 20 al 0,05%. En la etapa siguiente, en cada pocillo se añadieron 100 ml de la solución de anticuerpo que debía someterse a ensayo (sobrenadante de cultivo) y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Tras 3 etapas de lavado con NaCl al 0,9% (p/v)/Tween® al 0,05% por pocillo, se añadieron 100 ml de un fragmento F(ab')₂ marcado con peroxidasa de rábano picante de un anticuerpo policlonal de oveja anti-Fc γ de ratón, para la detección de anticuerpo unido de la muestra, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación. A continuación, se llevó a cabo el lavado tal como anteriormente. Finalmente, en cada pocillo se añadieron 100 ml de ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, nº de catálogo 1684302). Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la extinción (DO) a 405 y 492 nm [405/492] en un lector comercial de placas de microtitulación de ELISA. Este cribado condujo a la selección de anticuerpos que se unían bien a IgG de Cynomolgus y que mostraban una reactividad cruzada nula/baja con la IgG humana. Esta selección de anticuerpos se sometió adicionalmente al ensayo b).

b) Selección de anticuerpos sin reactividad cruzada detectable con la IgG humana

40 Con el fin de identificar, a partir de la selección de anticuerpos del cribado primario a), aquellos que no mostraban reactividad cruzada detectable con la IgG humana, se llevó a cabo el ensayo descrito a continuación. Se recubrieron MPT prerrecubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat, Bernried, lote nº MC 1098) con IgG de Cynomolgus biotinilada, 250 ng/ml, en PBS (solución salina tamponada con fosfato) con BSA II al 1,0% (100 ml en cada pocillo, 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, con agitación), y posteriormente se lavaron 3 veces con NaCl al 0,9% (p/v)/Tween® 20 al 0,05%. En la etapa siguiente, en cada pocillo se añadieron 100 ml de la solución de anticuerpo que debía someterse a ensayo (sobrenadante de cultivo) y 50 ml de PBS (señal de referencia) ó 50 ml de una solución de IgG humana (80 mg/ml; concentración final del ensayo: 27 mg/ml; señal del ensayo), respectivamente, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Tras tres etapas de lavado con NaCl al 0,9% (p/v)/Tween® al 0,05% por pocillo, se añadieron 100 ml de un fragmento F(ab')₂ marcado con peroxidasa de rábano picante de un anticuerpo policlonal de oveja anti-Fc γ de ratón, para la detección de anticuerpo unido de la muestra, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación. A continuación, se llevó a cabo el lavado tal como anteriormente. Finalmente, en cada pocillo se añadieron 100 ml de ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, nº de catálogo 1684302). Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la extinción a [405/492] nm en un lector comercial de placas de microtitulación de ELISA. Los anticuerpos que mostraban una señal de ensayo no significativamente diferente de la señal de referencia asociada se seleccionaron para la utilización posterior. En términos cuantitativos, lo anterior equivalente a una reactividad cruzada estimada con la IgG humana <0,001%. (Definición de "no significativamente diferente": señal de ensayo=90% a 110% de la señal de referencia).

Ejemplo 4

Preparación de un conjugado de IgG de Cynomolgus (IgG-Cyno) e IgG humana (IgG-H)

5 a) Preparación de IgG-Cyno-SATP

10 La IgG de Cynomolgus purificada a partir de suero de Cynomolgus mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel se dializó frente a tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,1, y la solución de proteínas resultante se ajustó a una concentración de proteínas de aproximadamente 10 mg/ml. Se disolvió N-succinimidil-3-acetiltiopropionato (SATP) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (IgG:SATP). La mezcla se incubó durante 60 minutos a 25°C a pH 7,1. La reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM; el pH se ajustó a 6,1, y el exceso de SATP se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM, con NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

15 b) Preparación de IgG-H-MH

20 La IgG humana purificada a partir de suero humano mediante cromatografía de intercambio iónico se dializó frente a tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,1, y la solución de proteínas resultante se ajustó a una concentración de proteínas de aproximadamente 20 mg/ml. Se disolvió éster de N-maleimidoheptanoil-N-hidroxisuccinimida (MHS) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:6 (IgG:MHS). La mezcla se incubó durante 60 minutos a 25°C a pH 7,1. La reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM; el pH se ajustó a 6,1, y el exceso de MHS se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM, con NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

25 c) Conjugación de IgG-Cyno-SATP con IgG-H-MH

30 Se desacetiló IgG-Cyno-SATP en IgG-Cyno-SH mediante la adición de solución de hidroxilamina 1 M al 2,5% (v/v), pH 7,5, e incubando durante 60 minutos a 25°C. El anticuerpo desacetilado se mezcló con IgG-H-MH (proporción molar de IgG-Cyno-SH: IgG-H-MH=1:1) hasta una concentración final de aproximadamente 7 mg/ml de IgG totales. El pH se ajustó a 7,1 y la mezcla se incubó a 25°C. El procedimiento de conjugación se analizó con una columna analítica de filtración en gel (por ejemplo TSK 3000). El procedimiento de conjugación se detuvo tras 40 minutos en general, mediante la adición de cisteína hasta una concentración final de 2 mM. Tras 30 minutos de incubación, se añadió N-metilmaleimida (NMM) hasta una concentración final de 5 mM y se ajustó el pH a 7,5. Tras 60 minutos de incubación a 25°C, se separó el conjugado mediante cromatografía de filtración en gel con Sephacryl S-300 para eliminar los anticuerpos no conjugados.

Ejemplo 5

40 Preparación de anticuerpo monoclonal digoxigenilado anti-Fc de Cynomolgus

45 a) Preparación de anticuerpo monoclonal digoxigenilado anti-Fc de Cynomolgus

45 El sobrenadante de fermentación del anticuerpo monoclonal anti-Fc de Cynomolgus se concentró aproximadamente diez veces, se transfirió a un tampón con TRIS 20 mM, sulfato amónico 1 M, pH 9,0, y se aplicó a proteína A-sefarosa. El eluido con citrato sódico 0,2 M a pH 3,0 se dializó frente a tampón fosfato, pH 7,5. Se separaron los contaminantes de la IgG bovina (de FCS en el caldo de fermentación) mediante inmunoabsorción con anticuerpos inmovilizados contra IgG bovina.

50 b) Digoxigenilación de anticuerpo monoclonal anti-Fc de Cynomolgus

55 Una solución del anticuerpo monoclonal anti-Fc de Cynomolgus en tampón fosfato se ajustó a pH 8,1 y a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml. Se disolvió en DMSO ácido digoxigenín-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico-éster de N-hidroxisuccinimida y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5. La reacción se detuvo tras 60 minutos mediante la adición de L-lisina y el exceso de reactivo de marcaje se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 50 mM, con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Ejemplo 6

60 Evaluación de la unión/especificidad de anticuerpo con el sistema BIAcore®

65 Todas las mediciones se llevaron a cabo con el aparato BIAcore®2000 utilizando un chip CM5. El recubrimiento de este chip con un anticuerpo se consiguió mediante acoplamiento estándar de aminas. A menos que se indique lo contrario, todas las incubaciones se llevaron a cabo en tampón HBS (HEPES, NaCl, pH 7,4) a 25°C. Una cantidad saturante de anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus, mAb M-R10Z8E9 y anticuerpo policlonal anti-Fcy humano (Dianova, Alemania), respectivamente, se inmovilizó mediante acoplamiento de aminas en diferentes

canales del mismo chip CM5. Todos los sueros animales se diluyeron en tampón HBS que contenía 1 mg/ml de CM-dextrano a una concentración final de 1%. La unión se analizó mediante inyección de los sueros diluidos 1 en 100 y la incubación durante 60 segundos. La disociación se midió mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 180 segundos. Utilizando software de evaluación BIA de BIAcore®, se calcularon los valores de constante de disociación ($=K_{Dis}$) con un modelo de ajuste 1:1 de Langmuir. Para todos los sueros animales este cálculo se basa en la suposición de que el nivel de IgG es de 15 mg/ml. Los valores de señal 80 segundos después del inicio de la inyección del anticuerpo de ensayo se seleccionaron para la comparación de la cantidad de IgG unida (UR en la Tabla 2).

5

10

Tabla 2:

Señales de unión [UR] de sueros animales a anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus y un antisuero policlonal anti-Fcγ humano				
Muestra (suero)	mAb anti-Cynomolgus (clon 3.25.12)		PAb<H-Fcγ>	
	UR unión	K_{Dis} en moles/l	UR unión	K_{Dis} en moles/l
Tití	-31,4	falta de unión	532	$1,41*10^{-08}$
Babuino	2038,5	$9,39*10^{-13}$	1404,6	$6,37*10^{-11}$
Rata	-20,9	falta de unión	48,2	falta de unión
Chimpancé	-28,2	falta de unión	1918,1	$3,72*10^{-13}$
Muestra (suero)	mAb anti-Cynomolgus (clon 3.25.12)		PAb<H-Fcγ>	
Cynomolgus	2278,7	$2,03*10^{-09}$	1344,8	$7,17*10^{-12}$
Macaco Rhesus	2362,8	$5,09*10^{-10}$	1172,1	$9,08*10^{-11}$
NMRI-ratón	-15,7	falta de unión	-23,8	falta de unión
ser humano	-25,5	falta de unión	1571,6	$4,56*10^{-12}$
Perro	-35,9	falta de unión	564,3	$1,15*10^{-08}$
Muestra (suero)	mAb anti-Cynomolgus (clon 3.25.12)		PAb<H-Fcγ>	
CD1-ratón	-40,4	falta de unión	-30,7	falta de unión

La Tabla 2 muestra que el anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus no reacciona cruzadamente con suero humano. Sólo se detectó IgG comprendida en suero de Cynomolgus, Rhesus y babuino. En contraste con el anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus, el anticuerpo policlonal anti-Fc humano muestra una elevada reactividad con sueros humano, de perro y de todas las especies de mono sometidas a ensayo.

15

Ejemplo 7

Ensayo del complejo AF/AAF -sin adición de AF.

20

Se unió mAb M-R10Z8E9 biotilado a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina (SA-PMT) en la primera etapa. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Después, las muestras de suero de mono y los estándares de referencia (IgG humana químicamente conjugada con IgG de Cynomolgus añadida a suero de Cynomolgus al 1%) se incubaron en los pocillos. Tras eliminar mediante lavado las sustancias no unidas, el complejo AF/AAF unido se detectó con anticuerpos anti-Cynomolgus digoxigenilados, seguido de la incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado de anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS®. Se midió la señal utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm ([405/490] nm)). Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por duplicado. Un esquema que ejemplifica este sistema de ensayo se muestra en la figura 1.

25

30

Ejemplo 8

Ensayo del complejo AF/AAF -sin adición de AF.

35

Antes del análisis de muestras, se diluyeron muestras de suero de mono en tampón basado en PBS y se añadió anticuerpo de fármaco. Tras preincubar durante 15 minutos, las muestras se analizaron en el ELISA anteriormente indicado. Un esquema que ejemplifica este sistema de ensayo se muestra en la figura 2.

40

Ejemplo 9

Detección de complejos de AF/AAF en muestras de un estudio PK de Cynomolgus.

45

Se analizaron muestras de suero de un estudio PK (PK=farmacocinético) de dosis únicas en Cynomolgus con un anticuerpo humano contra IGF-1R (documento WO nº 2005/005635, 3 mg/kg, i.v.) con el ELISA anteriormente

indicado: i) detección de complejos de AF/AAF sin adición de anticuerpo de fármaco (figura 5), e ii) detección de complejos de AF/AAF sin adición de anticuerpo de fármaco (figura 6). En 8 puntos temporales entre 0 h y 1.176 h tras la dosificación, se recolectaron y analizaron las muestras de suero. Se proporciona en el gráfico la cantidad de complejos AF/AAF (señal de DO a 405 nm) vs. tiempo tras la dosificación. Tal como muestra la figura 5, sólo se detectaron señales positivas sin adición *in vitro* de anticuerpo de fármaco en las muestras de suero entre 336 h y 672 h (pico) en el caso de que se formasen complejos de AF/AAF *in vivo*. En ausencia de anticuerpos antifármaco, no se formaron complejos inmunológicos y no se detectaron señales positivas (puntos temporales anteriores a 336 h). Debido a la ausencia de fármaco en muestras 672 h después de la dosificación o posteriormente, no podía detectarse ningún complejo. Al añadir anticuerpo de fármaco a la muestra de suero como etapa de preincubación se detectaron/eran detectables complejos de AF/AAF tanto formados *in vivo* como formados *in vitro*. Una señal positiva sólo depende de la generación de AAF, tal como se demuestra en la figura 6. Ambos diagramas (figuras 5 y 6) se correlacionan bien con la curva de fármaco-tiempo.

Ejemplo 10

Ensayo de detección de AAF utilizando anticuerpos anti-Cynomolgus.

Se unió anticuerpo de fármaco biotinilado (anticuerpo humano contra IGF-1R) se unió a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina (SA-PMT) en la primera etapa. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Posteriormente, se incubaron las muestras de suero de mono (diluido 20 veces en tampón basado en PBS) y los estándares de referencia. Tras eliminar mediante lavado las sustancias no unidas, el anticuerpo antifármaco (AAF) unido se detectó con anticuerpos anti-Cynomolgus digoxigenilados, seguido de la incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado de anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS[®]. Se midió la señal utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado. Un esquema que ejemplifica este sistema de ensayo se muestra en la figura 3.

Ejemplo 11

Preparación de anticuerpos policlonales contra IgG de Cynomolgus

a) Purificación de anticuerpos policlonales a partir de suero de conejo.

Se inmunizaron conejos con Fc de Cynomolgus siguiendo métodos estándares. En el suero en bruto de cinco conejos inmunizados con Fc de Cynomolgus, se eliminaron los componentes lipídicos mediante deslipidación con Aerosil (al 1,5% (p/v)) y se precipitaron las inmunoglobulinas con sulfato amónico (1,7 M). Tras el tratamiento ácido (30 minutos, a pH 5,5) y diálisis frente a tampón fosfato potásico 15 mM, suplementado con NaCl 50 mM, pH 7,0, la mezcla se separó mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE a pH 7,0 y la fracción de IgG en el eluido (=anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de Cynomolgus) se concentró a aproximadamente 25 mg/ml.

b) Preparación de anticuerpos policlonales de conejo anti-IgG de Cynomolgus purificados por afinidad (pAb<IgG Cyno>) sin reactividad cruzada con la IgG humana

La fracción de IgG concentrada de la etapa a) se transfirió a un sistema de tampones con fosfato potásico 50 mM, suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,5 (PBS). El inmunosorbente con IgG de Cynomolgus inmovilizado, preparado mediante conjugación de IgG de Cynomolgus a NHS-sefarosa mediante técnicas del estado de la técnica, se empaquetó en una columna y se equilibró con tampón fosfato potásico 50 mM, suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Se aplicaron 10 mg de IgG/ml de inmunosorbente a la columna equilibrada con PBS. La columna se lavó sucesivamente con PBS, NaCl 0,5 M suplementada con Tween[®] 20 al 0,05% (p/v) y NaCl 30 mM. La IgG unida específicamente a la matriz de afinidad se eluyó con HCl 3 mM y ácido propiónico 1 M y se dializó frente a PBS.

Para eliminar los anticuerpos con reactividad cruzada para la IgG humana, los anticuerpos purificados por afinidad se aplicaron a una columna de afinidad con IgG humana inmovilizada, preparados mediante conjugación de IgG humana no específica con NHS-sefarosa mediante técnicas del estado de la técnica. La columna se equilibró con PBS. Se aplicaron a la columna aproximadamente 6 mg de IgG/ml de inmunosorbente. La fracción de IgG policlonal específica se encontraba en el eluido. A continuación se regeneró la columna con NaCl 0,5 M suplementado con Tween[®] 20 al 0,05% (p/v), NaCl 30 mM, ácido propiónico 1 M y PBS. Se repitió dos veces la inmunosorción de la IgG de unión no específica para eliminar por completo los anticuerpos con reactividad cruzada con la IgG humana.

El anticuerpo policlonal anti-IgG de Cynomolgus purificado resultante sin reactividad cruzada con la IgG humana se concentró a aproximadamente 4 mg/ml y se almacenó a -80°C.

Ejemplo 12

Evaluación de la unión/especificidad de anticuerpo de los anticuerpos policlonales de conejo anti-Fc de Cynomolgus (pAb<Fc-Cyno>) mediante el sistema BIAcore®

5 Todas las mediciones se llevaron a cabo con el aparato BIAcore®2000 utilizando un chip CM5. El recubrimiento de este chip con un anticuerpo se consiguió mediante acoplamiento estándar de aminas. A menos que se indique lo contrario, todas las incubaciones se llevaron a cabo en tampón HBS (HEPES, NaCl, pH 7,4) a 25°C. Una cantidad saturante de anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus se inmovilizó mediante acoplamiento de aminas sobre el chip CM5. Todos los sueros animales se diluyeron en tampón HBS que contenía 1 mg/ml de CM-dextrano a una concentración final de 1%. La unión se analizó mediante inyección de los sueros diluidos 1 en 100 y la incubación durante 60 segundos. La disociación se midió mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 180 segundos. Utilizando software de evaluación BIA de BIAcore®, se calcularon los valores de constante de disociación ($=K_{Dis}$) con un modelo de ajuste 1:1 de Langmuir. Para todos los sueros animales este cálculo se basa en la suposición de que el nivel de IgG es de 15 mg/ml. Los valores de señal 80 segundos después del inicio de la inyección del anticuerpo de ensayo se seleccionaron para la comparación de la cantidad de IgG unida (UR en la Tabla 3).

Tabla 3:

Señales de unión [UR] de sueros animales a anticuerpo policlonal anti-IgG de Cynomolgus		
Muestra (suero)	pAb anti-Cynomolgus	
	UR unión	K_{Dis} en moles/l
Tití	50,8	$1,80 \cdot 10^{-7}$
Babuino	1297,4	$4,11 \cdot 10^{-10}$
Rata	-12,4	falta de unión
Chimpancé	3,8	falta de unión
Cynomolgus	1357,9	$1,92 \cdot 10^{-9}$
Macaco Rhesus	1244,6	$2,16 \cdot 10^{-9}$
NMRI-ratón	42,1	$4,27 \cdot 10^{-6}$
ser humano	-6,7	falta de unión
Perro	-10	falta de unión
CD1-ratón	-15,9	falta de unión

20 La Tabla 3 muestra que el anticuerpo policlonal anti-IgG de Cynomolgus no reacciona cruzadamente con suero humano. Sólo se detectó la IgG de mono comprendida en suero de mono tití, Cynomolgus, Rhesus y babuino. En contraste con el anticuerpo monoclonal anti-IgG de Cynomolgus, el anticuerpo policlonal anti-IgG de Cynomolgus muestra reactividad con el suero de ratón NMRI. Además, el anticuerpo policlonal anti-IgG de Cynomolgus no se une a la IgG humana y presenta una diferencia de reactividad de por lo menos 100 veces entre la reactividad con la IgG de mono y con la IgG de mono.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación inmunológica de un complejo inmunológico (complejo AF/AAF) de un anticuerpo de fármaco (AF) humano o humanizado y un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármaco (anticuerpo antifármaco, AAF) en una muestra de una especie de mono seleccionada de entre Cynomolgus, Rhesus y babuino utilizando un ensayo de tipo sándwich, que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, caracterizado porque uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo de unión específica a IgG de Cynomolgus y que no se une a IgG humana y el otro anticuerpo es un anticuerpo de unión específica a inmunoglobulina humana y que no se une a IgG de Cynomolgus y porque la muestra se preincuba con una cantidad predeterminada de dicho anticuerpo de fármaco.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo de captura es un anticuerpo que se une específicamente a IgG humana y el anticuerpo trazador es un anticuerpo que se une específicamente a IgG de Cynomolgus y que no se une a inmunoglobulina humana.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo de captura es un anticuerpo que se une específicamente a IgG de Cynomolgus y que no se une a inmunoglobulina humana y el anticuerpo trazador es un anticuerpo que se une específicamente a la IgG humana.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el anticuerpo de unión específica a IgG de Cynomolgus y/o el anticuerpo de unión específica a inmunoglobulina humana es/son monoclonales.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la cantidad de complejo formada se correlaciona con la concentración de complejo AF/AAF, de AF y/o de AAF.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el anticuerpo de captura se inmoviliza mediante una pareja de unión específica.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el anticuerpo trazador se conjuga con el marcaje detectable mediante una pareja de unión específica.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque el anticuerpo trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcaje detectable se lleva a cabo mediante un anticuerpo contra la digoxigenina.

Fig. 1

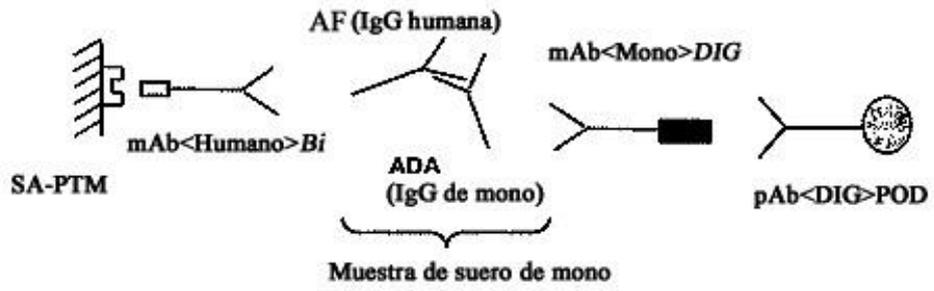


Fig. 2

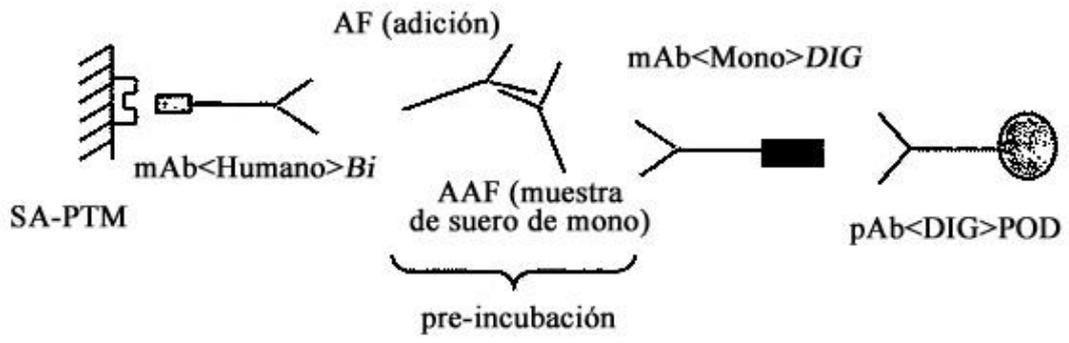


Fig. 3

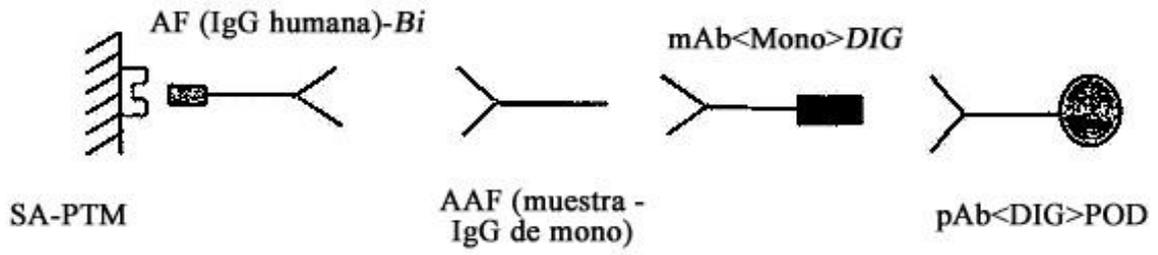


Fig. 4

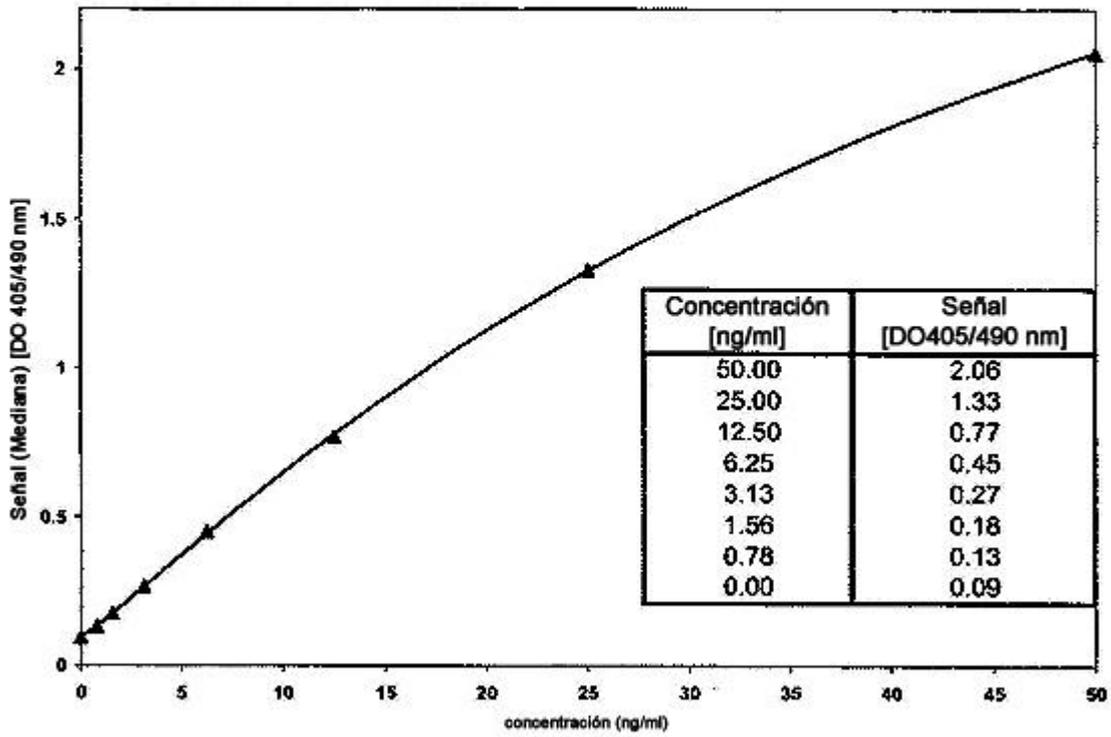


Fig. 5

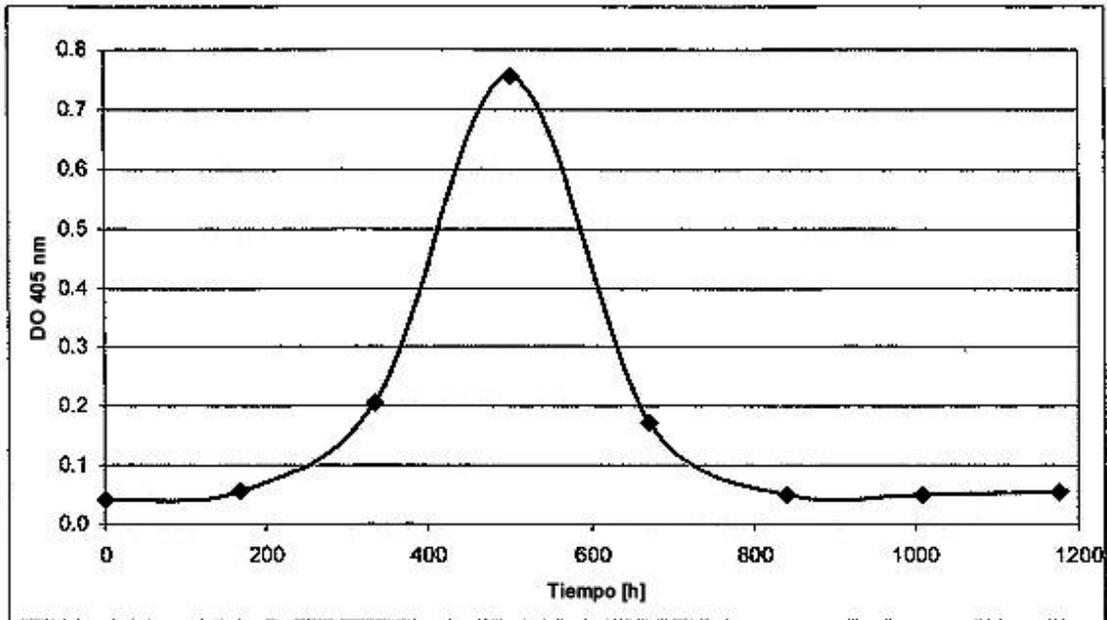


Fig. 6

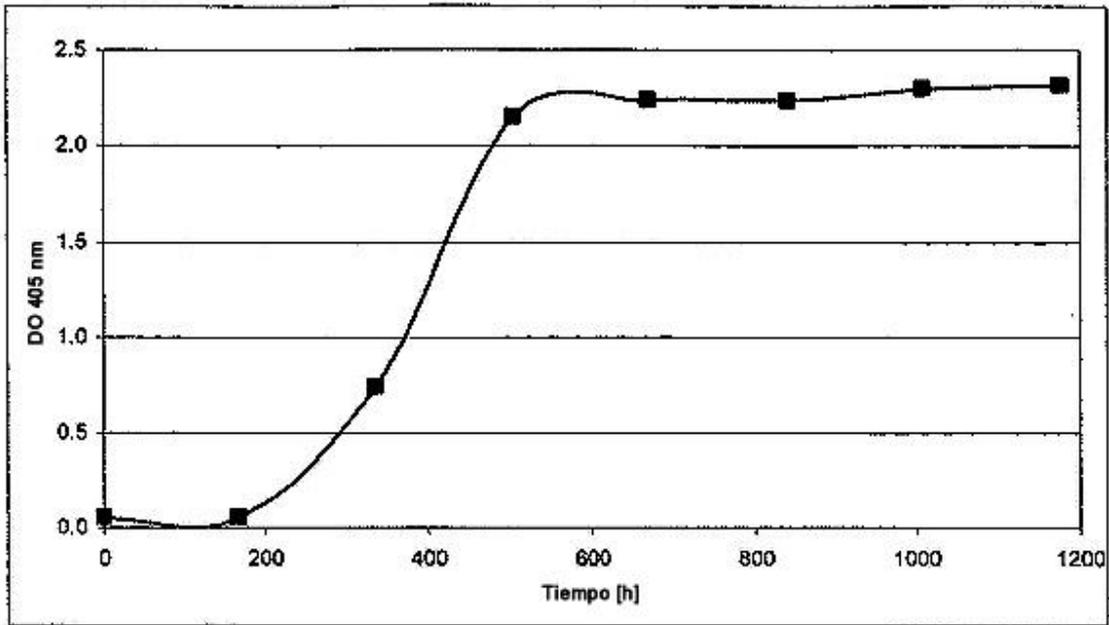


Fig. 7

