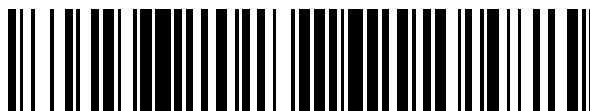


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 486**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2007** **E 07846659 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015** **EP 2089434**

54 Título: **Conjugado antiidiotípico y utilización del mismo como estándar en un inmunoensayo**

30 Prioridad:

21.11.2006 EP 06024133

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

26.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR;
VOGEL, RUDOLF y
WESSELS, UWE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 561 486 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

Conjugado antiidiotípico y utilización del mismo como estándar en un inmunoensayo

- 5 La invención comprende un conjugado y su utilización como estándar o control positivo en un inmunoensayo 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 un soporte sólido (anticuerpo de captura), el antígeno y un anticuerpo contra otro epítipo del antígeno conjugado con un marcaje detectable (anticuerpo trazador). De esta manera, se forma un sándwich: soporte sólido-anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo trazador. En el sándwich, la intensidad del marcaje detectable conjugado con el anticuerpo es proporcional a la concentración del antígeno en el medio de incubación. El método de tipo sándwich estándar también se denomina inmunoensayo de puente de doble antígeno debido a que los anticuerpos de captura y trazador se unen a epítopos diferentes del antígeno. Hoesel W. et al., J. Immunol. Methods 294:101-110, 2004, informan de un ensayo de puente de doble antígeno anti-EPO en el que se utilizó una mezcla de EPOrh inmovilizado acoplado a grupos amino y a grupos carbohidrato.
- 15
- 20 Los inmunoensayos tales como el ELISA de puente de doble antígeno son tipos de ensayo comunes en investigación de la respuesta inmunogénica de un paciente a un fármaco anticuerpo (anticuerpo terapéutico o diagnóstico). 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 dirigido contra fármaco se mencionan en, por ejemplo, los documentos nº WO 2005/045058 y nº WO 90/006515. Los ensayos de anticuerpos antiidiotípicos se mencionan en, por ejemplo, la patente US nº 5.219.730, el documento nº WO 87/002778 y las 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 agentes biológicos terapéuticos.
- 25
- 30 El análisis sérico de anticuerpos humanos antihumanos se describe en Ritter G., Cancer Res. 61:6851-6859, 2001 y en el documento nº WO 2003/016909. La identificación de anticuerpos humanos antihumanos de clase IgG requiere una etapa adicional de precipitación de proteína G antes del ensayo.
- 35 La patente EP nº 0113431 informa de anticuerpos monoclonales antiidiotípicos contra anticuerpos humanos anti-ADN. Los anticuerpos se utilizan como reactivos diagnósticos en métodos para determinar la presencia de anticuerpos anti-ADN nativo en suero de pacientes que se sospecha que presentan lupus eritematoso sistémico.
- 40 Los fragmentos de unión a antígeno denominados 4B5 que detectan específicamente las células de cáncer, nucleótidos codificantes de los fragmentos y la utilización de los mismos para la profilaxis y detección de cánceres se describe en el documento nº WO 99/02545.

Descripción resumida de la invención

- 45 La invención comprende un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente a una región CDR de un anticuerpo parental y a una inmunoglobulina de referencia de una única clase de inmunoglobulina.
- 50 Dicha inmunoglobulina de referencia no se une específicamente a dicho anticuerpo antiidiotípico y dicho anticuerpo parental.
- La invención comprende además la utilización de un conjugado según la invención a modo de estándar en un inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo dirigido contra un anticuerpo parental en una muestra de un ser humano.
- 55 Preferentemente dicho conjugado se utiliza como estándar o como control positivo en una determinación inmunológica de un anticuerpo dirigido contra un anticuerpo parental en una muestra mediante la utilización de un inmunoensayo de tipo sándwich que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador.
- 60 Preferentemente dicho anticuerpo de captura o dicho anticuerpo trazador es dicho anticuerpo parental.
- Preferentemente dicho anticuerpo dirigido contra un anticuerpo parental es un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra dicho anticuerpo parental.
- 65 Preferentemente dicho anticuerpo parental es un anticuerpo terapéutico o un anticuerpo diagnóstico.

Preferentemente el anticuerpo de captura se selecciona de entre el grupo que comprende la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, o un fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ o F(ab')₂ de dicho anticuerpo parental.

5 Preferentemente la conjugación del anticuerpo de captura con el soporte sólido se lleva a cabo mediante adsorción pasiva.

Preferentemente el anticuerpo de captura se inmoviliza mediante una pareja de unión específica.

10 Preferentemente el anticuerpo de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se lleva a cabo mediante avidina o estreptavidina inmovilizada.

Preferentemente el anticuerpo trazador se conjuga con un marcaje detectable mediante una pareja de unión específica.

15 Preferentemente el anticuerpo trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcaje detectable se lleva a cabo mediante un anticuerpo contra la digoxigenina.

Preferentemente la determinación inmunológica se lleva a cabo mediante resonancia del plasmón superficial.

20 Preferentemente la conjugación del anticuerpo de captura y/o trazador con su pareja de conjugación se lleva a cabo mediante la unión química a través de sus grupos N-terminal 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 azúcar de la estructura de carbohidrato del anticuerpo.

25 Preferentemente el anticuerpo de captura se conjuga con el soporte sólido mediante adsorción física y por lo tanto el anticuerpo de captura conjugado con el soporte sólido que comprende una mezcla de por lo menos dos anticuerpos de captura que se conjugan con el soporte sólido en diferentes sitios del anticuerpo. 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, páginas 205 a 225, 1996.

30 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 parental de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se lleva a cabo mediante avidina o estreptavidina inmovilizada.

35 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 (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 parental trazador se conjuga mediante digoxigenina y un anticuerpo contra digoxigenina al marcaje detectable. Alternativamente, el anticuerpo parental trazador se conjuga con un marcaje electroquimioluminiscente, como un complejo de bispíridilo y rutenio.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención comprende un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específicamente a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de referencia de una única clase de inmunoglobulina. Preferentemente, dicho anticuerpo parental es un anticuerpo terapéutico. Preferentemente, dicho anticuerpo parental es un anticuerpo diagnóstico.

55 La expresión "anticuerpo antiidiotípico de unión específicamente a una región CDR de un anticuerpo parental" según la invención se refiere a un anticuerpo inducido contra un anticuerpo parental en un animal no humano, es decir, un anticuerpo no humano. Preferentemente, dicho anticuerpo inducido contra un anticuerpo parental se induce en un roedor o en un macaco, especialmente preferente es un ratón, un conejo o un mono Cynomolgus, o se obtiene mediante una técnica de expresión, preferentemente mediante expresión fágica o ribosómica. Preferentemente el anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo policlonal. También preferentemente el anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo monoclonal. La inmunización del animal se lleva a cabo preferentemente con el anticuerpo parental o fragmentos del mismo. En una etapa adicional, la inmunoglobulina de dicho animal se aísla y se purifica utilizando adsorción de afinidad respecto a la región o regiones CDR del anticuerpo parental. La expresión "región CDR de un anticuerpo parental" se refiere a las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo parental, es decir, comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo parental, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo parental.

La expresión "anticuerpo parental" según la invención se refiere a un anticuerpo que puede administrarse como fármaco (anticuerpo de fármaco o anticuerpo terapéutico) o como un medio diagnóstico (anticuerpo diagnóstico) en un individuo, de manera que se sospecha que una muestra de dicho individuo comprende dicho anticuerpo parental después de la administración. Dentro de un ensayo realizado según la invención el anticuerpo parental, el anticuerpo (parental) de captura y/o el anticuerpo (parental) trazador 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 en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como las enfermedades oncológicas (por ejemplo las neoplasias hematológicas y sólidas, incluyendo el linfoma no de Hodgkin, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal). Dichos anticuerpos se describen en, por ejemplo, Levene A.P. et al., *Journal of the Royal Society of Medicine* 98:146-152, 2005. Dichos anticuerpos son, por ejemplo, anticuerpos contra CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, HLA-DR, CD33, CD40, CD52, CD80, CSF-1R, CTLA-4, proteína de activación fibroblástica (PAF), EGFR, G250, GD3, HER2/neu, HER3, HER4, antígeno membranar específico de próstata (AM-EP), CD56, VEGF, VEGF2, TLSP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar a TNF (TWEAK), CEA, Ep-CAM, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor beta de linfotóxina, antígeno Y de Levis, hepsina, proteoglicano condroitín sulfato asociado al melanoma (MCSP), receptor de IL-1, receptor de IL-6, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF o receptor de IGF-1. Los anticuerpos terapéuticos también se describen en Groner B. et al., *Curr. Mol. Med.* 4:539-547, 2004, y en Harris M., *Lancet Oncol.* 5:292-302, 2004.

La expresión "inmunoglobulina de referencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una inmunoglobulina completa, es decir, una inmunoglobulina que comprende una región Fab y una región Fc, así como fragmentos de una inmunoglobulina completa, tal como la región Fc, el dominio C_H2 o el dominio C_H3. La "inmunoglobulina de referencia" es una inmunoglobulina humana o una región Fc de una inmunoglobulina humana. La "inmunoglobulina de referencia" no se une específicamente al anticuerpo antiidiotípico y no se une específicamente al anticuerpo parental del conjugado según la invención. La región Fc de una inmunoglobulina se obtiene mediante corte con pepsina o papaína de una inmunoglobulina completa. La inmunoglobulina de referencia es de una "clase de inmunoglobulina única". La expresión "clase de inmunoglobulina única" se refiere a que la inmunoglobulina de referencia comprende una secuencia de aminoácidos de región constante específica de clase de inmunoglobulina seleccionada de entre las clases de inmunoglobulina A, E, M y G. Para las secuencias de aminoácidos de región constante específicas de clase de inmunoglobulina ver, por ejemplo, Pink J.R. et al., *Biochem. J.* 117:33-47, 1970.

Un "anticuerpo anti-anticuerpo parental" es un anticuerpo de unión específica al anticuerpo parental, es decir, un anticuerpo dirigido contra un anticuerpo parental. De manera similar, un anticuerpo anti-anticuerpo de IL-6R es un anticuerpo de unión específica a un anticuerpo anti-IL-6R. Un "anticuerpo anti-anticuerpo parental" es un anticuerpo dirigido contra cualquier región del anticuerpo parental, tal como la región variable, la región constante o la glucestructura del anticuerpo parental. Dichos anticuerpos anti-anticuerpo parental pueden producirse durante la terapia de anticuerpos como una región inmunogénica de un paciente (ver Pan Y. et al., *FASEB J.* 9:43-49, 1995). Un "anticuerpo antiidiotípico" es un anticuerpo de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental. Un anticuerpo antiidiotípico se une específicamente a la región CDR1 de la cadena ligera, la región CDR2 de la cadena ligera, la región CDR3 de la cadena ligera, la región CDR1 de la cadena pesada, la región CDR2 de la cadena pesada o la región CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo parental.

Un anticuerpo parental (preferentemente monoclonal) ejemplar es un anticuerpo contra el receptor de IL-6 (anticuerpo anti-IL-6R). 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 o en el documento nº WO 2004/096274.

Un anticuerpo parental (preferentemente monoclonal) ejemplar es un anticuerpo contra el receptor de IGF-1 (anticuerpo anti-IGF-1R). Dicho anticuerpo se describe en, por ejemplo, el documento nº WO 2004/087756 o en el documento nº WO 2005/005635.

La expresión "de unión" o "de unión específica" según la invención se refiere a la unión a un antígeno, a una región constante de una inmunoglobulina, un anticuerpo parental o una región CDR de un anticuerpo parental con un valor de K_D inferior a 10^{-6} M ($M = \text{moles/l}$) (por ejemplo 10^{-12} M), más preferentemente con un valor de K_D en el intervalo de entre 10^{-9} M y 10^{-15} M en un ensayo BIAcore. La "unión no específica" se encuentra si el valor de K_D es superior a 10^{-5} M (por ejemplo 10^{-4} M).

Los principios de 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, informan de la inmovilización orientada de anticuerpos para la utilización en inmunoensayos. Los inmunoensayos mediados por avidina-biotina se informan en, por ejemplo, Wilchek M. y Bayer E.A., *Methods Enzymol.* 184:467-469, 1990.

Los anticuerpos, especialmente los dominios constantes de los mismos, contienen funcionalidades de cadena lateral de aminoácidos, es decir, grupos reactivos químicos, para el acoplamiento con una pareja de unión, tal como una superficie, una proteína, un polímero (tal como PEG, celulosa o poliestirol), un enzima, o un elemento de una pareja

de unión. Los grupos reactivos químicos de los anticuerpos son, por ejemplo, grupos amino (grupos amino epsilon de lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteínas y metioninas), grupos de ácido carboxílico (ácidos aspárticos, ácidos glutámicos) y grupos alcohólicos de azúcar. Dichos métodos se describen en, por ejemplo, Aslam M. y Dent A., Bioconjugation, MacMillan Ref. Ltd. 50-100, 1999.

Para la conjugación de polipéptidos, por ejemplo con soportes sólidos, se requieren agentes protectores químicos adecuados. Estos forman, por ejemplo, enlaces en aminas de cadena lateral no protegida y son menos estables y diferentes de los enlaces en el extremo N-terminal. Se conocen muchos agentes protectores químicos de este tipo (ver, por ejemplo, la patente EP nº 0 651 761). Entre los agentes protectores químicos preferentes se incluyen los anhídridos de ácido dicarboxílico cíclicos como los anhídridos maleicos o citraconílicos.

El término "muestra" incluye, aunque sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia de un ser humano. Entre dichas sustancias se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, sangre completa, suero o plasma de un individuo, los cuales son las fuentes más ampliamente utilizadas de muestras en la rutina clínica.

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

La expresión "soporte sólido" se refiere a una sustancia no líquida, e incluye chips, recipientes y partículas (incluyendo micropartículas y perlas) realizadas en materiales tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas y ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias de gel, tales como sílice, alúmina y geles de polímero; capilares, que pueden estar realizados en polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas, y cubetas, tubos u otros recipientes de muestra de espectrómetro. Un componente soporte sólido de un ensayo se distingue de las superficies sólidas inertes con las que puede estar en contacto el ensayo en que un "_soporte sólido" contiene por lo menos una fracción sobre su superficie, que está destinada a interactuar con el anticuerpo de captura, directa o indirectamente. Un soporte sólido puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta o placa de microtitulación, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como perlas y micropartículas. Las micropartículas también pueden utilizarse como soporte sólido para formatos de ensayo homogéneos. Puede utilizarse una diversidad de micropartículas que permiten 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(metilmetakrilato); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro, y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, vidrio y óxido de metal. Ver, por ejemplo, Martin C.R. et al., Analytical Chemistry-News & Features 70:322A-327A, 1998, que se incorpora como referencia en la presente memoria.

Un "chip" es un material sólido no poroso, tal como metal, vidrio o plástico. El material puede recubrirse opcionalmente, por completo o en determinadas áreas. Sobre la superficie del material se encuentra presente cualquier matriz de puntos, visible o en coordenadas. En cada punto puede inmovilizarse un polipéptido definido, con o sin un conector o espaciador, en la superficie del material.

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

La invención comprende un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de referencia de una clase de inmunoglobulina única.

La invención comprende un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de referencia de una clase de inmunoglobulina única seleccionada de entre el grupo que comprende la inmunoglobulina E humana, la inmunoglobulina G humana, la inmunoglobulina M humana o la inmunoglobulina A humana, es decir, la inmunoglobulina de referencia es de la clase IgE humana o de la clase IgG humana o de la clase IgM humana o de la clase IgA humana.

La presente invención comprende un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de referencia de una clase de inmunoglobulina única de unión no específica a dicho anticuerpo antiidiotípico y de unión no específica a dicho anticuerpo parental.

Dicho anticuerpo parental es un anticuerpo terapéutico o un anticuerpo diagnóstico. Preferentemente dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina no funcionalizable de una clase de inmunoglobulina única o de una región Fc de una inmunoglobulina de una clase de inmunoglobulina única.

La expresión "anticuerpo diagnóstico" se refiere a un anticuerpo que es un anticuerpo natural o un anticuerpo producido recombinantemente y que se utiliza para la detección y visualización de su antígeno diana. Se utiliza un anticuerpo diagnóstico, por ejemplo, en sistemas de ensayo (por ejemplo ELISA) o para la obtención de imágenes in vitro. Un anticuerpo diagnóstico puede ser, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico marcado.

Dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina humana o una región Fc de inmunoglobulina humana.

La inmunoglobulina de referencia proporciona una región constante específica de clase de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un anticuerpo anti-clase de inmunoglobulina, tal como un anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana. De esta manera, la inmunoglobulina de referencia proporciona el conjugado según la invención con una etiqueta específica de clase de inmunoglobulina, que puede identificarse específicamente con un anticuerpo específico de etiqueta. Por ejemplo, en el caso de que la etiqueta sea una región constante de inmunoglobulina G, un anticuerpo específico de etiqueta es un anticuerpo anti-inmunoglobulina G.

Preferentemente dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo policlonal y dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina policlonal. También preferentemente, dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo policlonal y dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina monoclonal. Todavía preferentemente, dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo monoclonal y dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina monoclonal.

El conjugado según la invención se obtiene mediante conjugación química de un anticuerpo antiidiotípico y una inmunoglobulina de referencia.

En el conjugado según la invención el anticuerpo antiidiotípico es una inmunoglobulina funcionalizable y la inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina no funcionalizable. Lo anterior se refiere a que el anticuerpo antiidiotípico se une específicamente a su anticuerpo diana, mientras que el anticuerpo de referencia no se une específicamente a cualquier antígeno humano. El anticuerpo de referencia se proporciona con el fin de presentar una región Fc tan similar como resulte posible a las inmunoglobulinas naturales y no unirse a antígenos. También se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que el anticuerpo antiidiotípico y el anticuerpo de referencia no sean el mismo anticuerpo, es decir, difieren en por lo menos 20% de los residuos aminoácidos, es decir, presentan una identidad basada en la secuencia de aminoácidos de 80% o inferior. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. El término "monoclonal" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una población de anticuerpo producida por una única célula y/o su progenie. El término se refiere a que los anticuerpos presentan la misma secuencia de aminoácidos, es decir, los anticuerpos presentan una secuencia de aminoácidos idéntica a pesar de las mutaciones aleatorias que se producen durante la propagación de la célula o células que lo producen.

La expresión "inmunoglobulina no funcionalizable" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una inmunoglobulina que se une a un antígeno humano con un valor de K_D (afinidad de unión) de 10^{-5} moles/l o superior (por ejemplo 10^{-3} moles/l), preferentemente con un valor de K_D de 10^{-6} moles/l o superior. La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia del plasmón superficial (BIAcore®). Esta valor de afinidad de unión no debe considerarse un valor exacto: es meramente un punto de referencia. Se utiliza para determinar y/o seleccionar las inmunoglobulinas que no muestran una unión específica típica de inmunoglobulina a antígenos humanos y que, de esta manera, no presentan actividad terapéutica en el ser humano. Lo anterior no excluye que la inmunoglobulina muestre una unión específica a antígenos no humanos. Esta unión específica de un antígeno no humano se asocia a un valor de K_D de 10^{-7} moles/l o inferior (por ejemplo 10^{-10} moles/l), preferentemente con un valor de K_D de 10^{-8} moles/l o inferior.

A partir de transfectomas, es decir en células linfoides que contienen genes de inmunoglobulina transfectados obtenidos de ratones inmunizados, puede obtenerse un conjugado según la invención mediante conjugación al nivel de los ácidos nucleicos.

La administración de fármacos en mamíferos originados fuera del organismo receptor, por ejemplo la administración de polipéptidos terapéuticos exógenos, resulta en una respuesta inmunológica del mamífero receptor. Esta respuesta inmunológica se pone de manifiesto por la presencia de anticuerpos dirigidos contra el fármaco. Para la evaluación de dicha respuesta inmunológica se requiere un método para la detección de los anticuerpos dirigidos contra el fármaco.

El conjugado según la invención puede utilizarse como estándar en un inmunoensayo. De esta manera, la invención comprende la utilización de un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de referencia de una clase de inmunoglobulina única como estándar en un inmunoensayo de determinación de un anticuerpo anti-anticuerpo parental en una muestra procedente de un ser humano.

Además, el conjugado según la invención puede utilizarse a modo de control positivo en un inmunoensayo. Permite, por ejemplo, el establecimiento de un límite de detección. De esta manera, la invención comprende la utilización de

un conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de referencia de una clase de inmunoglobulina única a modo de control positivo en un inmunoensayo de determinación de un anticuerpo anti-anticuerpo parental en una muestra procedente de un ser humano. Preferentemente, dicho conjugado se añade en la presente realización a la muestra de un ser humano antes del inmunoensayo.

El anticuerpo parental es un anticuerpo terapéutico. Preferentemente, el anticuerpo parental es un anticuerpo murino, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano. Preferentemente, el anticuerpo parental es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano. Resulta especialmente preferente es que dicho anticuerpo parental sea un anticuerpo terapéutico quimérico, humanizado o humano. Para la detección de anticuerpos contra un anticuerpo parental pueden utilizarse diferentes métodos, tales como el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), los ensayos inmunoradiométricos (IRMA) o la resonancia del plasmón superficial (RPS).

La expresión "anticuerpo terapéutico" y los equivalentes gramaticales de la misma utilizados en la presente solicitud se refiere a un anticuerpo, preferentemente monoclonal, que está destinado a la administración en mamíferos, preferentemente seres humanos, para la utilización en el tratamiento, la terapia o el diagnóstico de una enfermedad. Generalmente se produce un anticuerpo terapéutico por medios recombinantes, por ejemplo mediante el cultivo de una célula eucariótica transfectada con un ácido nucleico codificante de dicho anticuerpo terapéutico. Preferentemente el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano. El anticuerpo terapéutico se administra para conseguir un efecto deseado, tal como, por ejemplo, la eliminación de las células diana, o la mediación de la CCDA (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) o la mediación de la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Las células diana puede ser, por ejemplo, células de cáncer o células infectadas por virus. Para la medicación de la CCDA o la CDC, el anticuerpo terapéutico debe unirse a la célula diana y es, de esta manera, específico, es decir de unión específica para, por ejemplo, un antígeno tumoral.

Un "antígeno tumoral", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye el significado conocido de la técnica, que incluye cualquier molécula expresada sobre (o asociada al desarrollo de) una célula tumoral que es conocido o se cree que contribuye a una característica tumorigénica de la célula tumoral. Se conocen de la técnica numerosos antígenos tumorales. Si una molécula es un antígeno tumoral también puede determinarse según técnicas y ensayos bien conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, ensayos clonogénicos, ensayos de transformación, ensayos de formación de tumores in vitro o in vivo, ensayos de migración en gel, análisis de inactivación génica, etc. Preferentemente, la expresión "antígeno tumoral" utilizada en la presente memoria se refiere a una proteína transmembranal humana, es decir, una proteína de membrana celular que se encuentra anclada en la bicapa lipídica de las células. La proteína transmembranal humana generalmente comprende un "dominio extracelular" tal como se utiliza en la presente memoria, que puede unirse a un ligando, dominio transmembranal lipofílico, dominio intracelular conservado, por ejemplo un dominio de tirosina quinasa y un dominio de señalización carboxilo-terminal que incluye varios residuos de tirosina que puede fosforilarse. Entre los antígenos tumorales se incluyen moléculas tales como EGFR, HER2/neu, HER3, HER4, EpCAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor de linfotóxina beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF-1R, CTLA-4, proteína de activación fibroblástica (PAF), hepsina, proteoglicano condroitín sulfato asociado al melanoma (MCSP), antígeno membranar específico de próstata (PSMA), receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, IGF1-R, TSLP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de tipo TNF de la apoptosis (TWEAK) o IL-1R.

Preferentemente, el conjugado según la invención se utiliza como estándar en una determinación inmunológica de un anticuerpo anti-anticuerpo parental en una muestra, utilizando un inmunoensayo de tipo sándwich que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador. Especialmente preferente es que dicho anticuerpo de captura o dicho anticuerpo trazador sea dicho anticuerpo parental.

Por ejemplo, se mencionan ensayos de anticuerpo dirigido contra fármaco en los documentos nº WO 2005/045058 y nº WO 90/006515; se mencionan ensayos de anticuerpo antiidiotípico en la patente US nº 5.219.730, el documento nº WO 87/002778 y las patentes EP nº 0 139 389 y nº 0 170 302.

Preferentemente, dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo monoclonal y dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina humana policlonal. También preferentemente dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo monoclonal y dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina humana monoclonal.

El conjugado según la invención preferentemente se utiliza como estándar en una determinación inmunológica de un anticuerpo antiidiotípico contra un anticuerpo parental en una muestra. Para la determinación inmunológica se utiliza un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador. En una realización, el anticuerpo de captura es el anticuerpo parental. Preferentemente el anticuerpo parental utilizadas como anticuerpo de captura es un anticuerpo completo, es decir, comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende un dominio variable y un dominio constante, y en el que la cadena pesada comprende un dominio variable, un dominio C_H1 , C_H2 , C_H3 y un dominio C_H4 opcional y una región bisagra. Preferentemente el anticuerpo de captura se selecciona de entre el grupo que comprende la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, un fragmento Fab, Fab',

$F(ab)_2$ o $F(ab')_2$ de dicho anticuerpo parental, es decir, es la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, el fragmento Fab o Fab' o $F(ab)_2$ o $F(ab')_2$ de dicho anticuerpo parental. En otra realización, el anticuerpo trazador es el anticuerpo parental. En dicha realización, por ejemplo, el conjugado según la invención se une al soporte sólido mediante una inmunoglobulina de unión específica a la inmunoglobulina de referencia del conjugado.

La conjugación de un anticuerpo trazador y/o de captura con su pareja de conjugación puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos, tales como la adsorción pasiva, la unión química o la unión mediante una pareja de unión específica. La expresión "pareja de conjugación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a, por ejemplo, soportes sólidos, polipéptidos, marcaposibles detectables y elementos de parejas de unión específicas. En una realización, la conjugación del anticuerpo de captura y/o trazador con su pareja de conjugación se lleva a cabo mediante la unión química mediante grupos N-terminales y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólicos del esqueleto de aminoácidos del anticuerpo, y/o grupos de alcohol de azúcar de la estructura de carbohidrato del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo de captura y/o trazador se conjuga con su pareja de conjugación mediante una pareja de unión específica. Preferentemente, el anticuerpo de captura se conjuga con biotina y la inmovilización con un soporte sólido se lleva a cabo mediante avidina o estreptavidina inmovilizada en un soporte sólido. Preferentemente, el anticuerpo trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcaje detectable se lleva a cabo mediante un anticuerpo contra la digoxigenina. El anticuerpo de captura en otra realización se conjuga con el soporte sólido mediante adsorción pasiva. Un anticuerpo conjugado con el soporte sólido mediante adsorción pasiva comprende una mezcla de anticuerpos conjugados con el soporte sólido mediante diferentes sitios de anticuerpo. De esta manera, el anticuerpo de captura conjugado con el soporte sólido mediante adsorción pasiva es una mezcla de dos o más conjugados diferentes, en el que los conjugados difieren en los sitios de anticuerpo, es decir, los residuos del anticuerpo, con los que se lleva a cabo la conjugación con el soporte sólido. La adsorción pasiva se describe en, por ejemplo, Butler J.E., "Solid Phases in Immunoassay", páginas 205 a 225; Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores): Immunoassays, Academic Press, San Diego, 1996.

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 esteroides, hormona/receptor de hormona, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G y/o L, etc. Preferentemente, el anticuerpo parental de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se lleva a cabo mediante avidina o estreptavidina inmovilizada. En otra realización preferente de la invención, el anticuerpo trazador se conjuga con un marcaje detectable, preferentemente se conjuga con 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 y/o L, etc. Preferentemente, el anticuerpo parental trazador se conjuga mediante digoxigenina y un anticuerpo contra la digoxigenina con el marcaje detectable. Alternativamente, el anticuerpo parental trazador se conjuga con un marcaje electroquimioluminiscente, tal como un complejo de bispíridilo y rutenio.

En el caso de que el conjugado según la invención se utiliza como estándar en un inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo antiidiotípico contra un anticuerpo parental en una muestra de un suero humano, preferentemente se utiliza a dos o más concentraciones diferentes. Con las respuestas determinadas a las diferentes concentraciones del estándar, se calcula o puede calcularse una curva de calibración.

En el caso de que el conjugado según la invención se utiliza como estándar en un inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo antiidiotípico contra un anticuerpo parental en una muestra de un ser humano, puede utilizarse un anticuerpo adicional (opcional) de unión específica a dicha inmunoglobulina de referencia de dicho conjugado. El conjugado según la invención puede utilizarse como estándar solo o en combinación con el anticuerpo anti-inmunoglobulina humana adicional opcional (figuras 3 y 4).

El término "estándar" o "sustancia estándar", que puede utilizarse intercambiabilmente en la presente solicitud, se refiere a un punto de referencia para un método analítico y se utiliza para fijar un valor frente al que se comparan otros resultados del mismo método analítico. La expresión "control positivo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia estándar con la que, en caso de utilizarse en un método analítico, se consigue una respuesta superior a un valor de corte o valor umbral definido. El valor de corte es, en general, el valor medio obtenido en el análisis de muestras que no contienen anticuerpo dirigidos contra fármaco más dos veces, preferentemente tres veces, la desviación estándar de los valores obtenidos.

En la presente memoria se informa de un método para la utilización de un conjugado según la invención como estándar en un inmunoensayo, que comprende las etapas siguientes: a) puesta en contacto del conjugado según la invención con un anticuerpo de captura, b) detección de la unión de dicho conjugado a dicho anticuerpo de captura. La detección de la unión en la etapa a) puede llevarse a cabo directamente, por ejemplo mediante un cambio en el ángulo de la RPS, o indirectamente, por ejemplo mediante un anticuerpo trazador y/o un marcaje detectable.

Se informa además en la presente memoria un método para la determinación de si un anticuerpo dirigido contra fármaco se une a la región Fc o a la región Fab de un anticuerpo parental y en qué clase de inmunoglobulina se encuentra dicho anticuerpo dirigido contra fármaco (ver, por ejemplo, la figura 7). En el presente método, se determina la unión de una muestra con anticuerpo parental inmovilizado, región Fc inmovilizada de dicho anticuerpo parental y/o región Fab inmovilizada de dicho anticuerpo parental. Lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un chip BIAcore, en el que uno de los cuatro canales contiene el anticuerpo parental inmovilizado, uno contiene la región Fc inmovilizada del anticuerpo parental y uno no contiene anticuerpo parental inmovilizado. Dependiendo de qué canales y, por lo tanto, qué parte o partes del anticuerpo parental muestren la unión de un anticuerpo dirigido contra fármaco de la muestra, puede determinarse la región de unión de un anticuerpo dirigido contra fármaco. La clase de inmunoglobulina se determina a partir de la unión del anticuerpo anti-inmunoglobulina E humana, anticuerpo anti-inmunoglobulina M humana, anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana o anticuerpo anti-inmunoglobulina A humana. Los anticuerpos anti-inmunoglobulina humana se utilizan secuencialmente o concomitantemente, preferentemente de manera secuencial. El conjugado según la invención puede utilizarse como estándar en dicho método.

Se informa además en la presente memoria un método para la determinación de la clase de inmunoglobulina de un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental en una muestra utilizando un inmunoensayo de tipo sándwich que comprende un anticuerpo de captura, un anticuerpo trazador y un conjugado según la invención, que comprende las etapas siguientes:

- a) puesta en contacto de dicha muestra con el anticuerpo de captura bajo condiciones adecuadas para la formación de un complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico,
- b) puesta en contacto separadamente de:
 - i) un anticuerpo anti-inmunoglobulina A humana,
 - ii) un anticuerpo anti-inmunoglobulina E humana,
 - iii) un anticuerpo anti-inmunoglobulina M humana,
 - y
 - iv) un anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana,
 como anticuerpos trazadores con dicho complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico,
- c) determinar la unión de cada uno de dichos anticuerpos trazadores a dicho complejo y determinar de esta manera la clase de inmunoglobulina de dicho anticuerpo antiidiotípico, en el que se utiliza un conjugado según la invención a modo de control positivo.

Un esquema de dicho método y un diagrama de respuesta ejemplar se proporcionan en las figuras 1 y 2.

Preferentemente, dicho anticuerpos trazadores se ponen en contacto en el orden i) anticuerpo anti-inmunoglobulina A humana, ii) anticuerpo anti-inmunoglobulina E humana, iii) anticuerpo anti-inmunoglobulina M humana, e iv) anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana, con dicho complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico, es decir, los anticuerpos trazadores se ponen en contacto secuencialmente.

Preferentemente dicho anticuerpo de captura se selecciona de entre el grupo que comprende la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada y un fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ o F(ab')₂ de dicho anticuerpo parental.

Se informa además en la presente memoria de un anticuerpo policlonal de unión específica a una región CDR de un anticuerpo anti-IL-6R. Se describe un método para la preparación de un anticuerpo policlonal en el Ejemplo 1a).

El método para la determinación de la clase de inmunoglobulina de un anticuerpo antiidiotípico tal como se informa en la presente memoria comprende las etapas siguientes:

- a) puesta en contacto de dicha muestra con el anticuerpo de captura bajo condiciones adecuadas para la formación de un complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico,
- b) puesta en contacto de un anticuerpo trazador seleccionado de entre el grupo de anticuerpo trazadores que comprende anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana, anticuerpo anti-inmunoglobulina M humana, anticuerpo anti-inmunoglobulina A humana con dicho complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico,
- c) determinación de la unión de dicho anticuerpo trazador a dicho complejo,
- d) desintegración de dicho complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico,
- e) repetición de las etapas a) a d) con un anticuerpo trazador no seleccionado anteriormente,
- f) determinación de la clase de inmunoglobulina de dicho anticuerpo antiidiotípico que debe ser la inmunoglobulina de dicho anticuerpo trazador de unión específica a dicho complejo de anticuerpo de captura/anticuerpo antiidiotípico.

El anticuerpo trazador puede seleccionarse de entre los anticuerpos anti-inmunoglobulina G humana o anticuerpo anti-inmunoglobulina E humana o anticuerpos anti-inmunoglobulina M humana o anticuerpos anti-inmunoglobulina A humana.

La expresión "bajo condiciones adecuadas para la formación de un complejo [...]" y equivalentes gramaticales de la misma tal como se utilizan en la presente solicitud se refiere a condiciones bajo las que un

anticuerpo/inmunoglobulina de interés, por ejemplo un anticuerpo antiidiotípico, se une a un segundo anticuerpo en el caso de que ponga en contacto con el mismo. Lo anterior no se refiere necesariamente a que el 100% del anticuerpo de interés se une, sino que se une esencialmente el 100% del anticuerpo de interés, es decir, se une por lo menos 85% del anticuerpo de interés, preferentemente se une por lo menos 90% del anticuerpo de interés, preferentemente se une por lo menos 95% del anticuerpo de interés, más preferentemente se une más de 95% del anticuerpo de interés, al segundo anticuerpo.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporciona 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

- Figura 1 Esquema para la detección de anticuerpos anti-anticuerpo parental en una muestra con la determinación opcional de la subclase correspondiente
- Figura 2 Diagrama de RPS BIAcore para la determinación de la subclase de un anticuerpo antiidiotípico según la invención. (1) Inyección de muestra, (2) + (3) inyección de anticuerpo anti-inmunoglobulina E humana, (4) inyección de anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana.
- Figura 3 Esquema para la utilización de un conjugado según la invención como estándar con un anticuerpo opcional específico de clase.
- Figura 4 Diagrama de RPS BIAcore para la utilización de un compuesto según la invención como estándar (primera respuesta) con un anticuerpo opcional correspondiente anti-subclase de inmunoglobulina estándar (segunda respuesta).
- Figura 5 Esquema de una determinación de ELISA de un anticuerpo antiidiotípico.
- Figura 6 Curva estándar de un ELISA para la determinación de un anticuerpo antiidiotípico.
- Figura 7 Esquema de una detección de canales múltiples de la región de unión de un anticuerpo anti-anticuerpo parental con la posterior determinación de clase de inmunoglobulina.

La utilización de un anticuerpo contra el receptor de IL-6 en los ejemplos siguientes sólo se proporciona a título de ejemplo de la invención y no pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de una composición de un anticuerpo antiidiotípico policlonal de unión específica a una región CDR de un anticuerpo parental y una inmunoglobulina de clase E, G, A y M de suero humano policlonal.

Anticuerpos policlonales anti-anticuerpo anti-IL-6R (pAb anti-mAb de IL-6R)

i) Preparación de anticuerpos policlonales contra el anticuerpo monoclonal anti-IL-6R

Purificación de anticuerpos policlonales a partir de suero de conejo

Se inmunizaron conejos con anticuerpo monoclonal anti-IL-6R siguiendo métodos estándares. En el suero en bruto de cinco conejos inmunizados, 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 con ácido (30 min., pH 5,5) y la diálisis frente a tampón de fosfato potásico 15 mM, complementado con NaCl 50 mM, pH 7,0, se separó la mezcla mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE a pH 7,0. La fracción de inmunoglobulina G se encontraba en el eluido (=pAb de conejo anti-anti-mAb de IL-6R) y se concentró a aproximadamente 25 mg/ml.

Preparación de anticuerpos de conejo anti-mAb de IL-6R de unión específica a una región CDR del anticuerpo parental contra IL-6R

La fracción IgG concentrada de la etapa anterior se transfirió a un sistema tampón con fosfato potásico 50 mM complementado con NaCl 150 mM, pH 7,5 (PBS). El inmosorbente con anticuerpo anti-IL-6R inmovilizado (anticuerpo parental), preparado mediante conjugación del anticuerpo anti-IL-6R a NHS-sefarsa mediante técnicas del estado de la técnica, se empaquetó en una columna y se equilibró con tampón de fosfato potásico 50 mM, complementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Se aplicaron 10 mg de fracción de inmunoglobulina G concentrada/ml de inmosorbente en la columna equilibrada con PBS. La columna se lavó sucesivamente con PBS, NaCl 0,5 M complementado con Tween® 20 al 0,05% (p/v) y NaCl 30 mM.

La IgG unida específicamente al inmosorbente se eluyó con HCl 3 mM y ácido propiónico 1 M. El eluido se dializó frente a PBS.

Para eliminar los anticuerpos con reactividad cruzada con la región constante de la inmunoglobulina G (IgG) humana, los anticuerpos purificados por afinidad se aplicaron a una columna de afinidad con IgG humana

inmovilizada, preparada 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 en la columna aproximadamente 6 mg de IgG/ml de inmunosorbente. La fracción de IgG policlonal específica deseada se encontraba en el eluido. Tras la regeneración de la columna con NaCl 0,5 M complementado con Tween® 20 al 0,05% (p/v), NaCl 30 mM, ácido priónico 1 M y PBS. La inmunosorción de anticuerpos de unión no específica a la región constante de la IgG humana se repitió dos veces para eliminar completamente anticuerpos con reactividad cruzada con la IgG humana.

El anticuerpo policlonal anti-anticuerpo anti-IL-6R purificado resultante sin reactividad cruzada con la región constante de la IgG humana se concentró hasta aproximadamente 4 mg/ml y se almacenó a -80°C.

ii) Conjugación del anticuerpo policlonal anti-anticuerpo anti-IL-6R con la inmunoglobulina E policlonal humana, la inmunoglobulina G humana, la inmunoglobulina A humana y la inmunoglobulina M humana

Preparación de un conjugado de anticuerpo policlonal anti-anticuerpo anti-IL-6R (pAb aa-IL-6R) con inmunoglobulina G humana

Etapas 1: preparación de pAb de conejo aa-IL-6R-SATP

El pAb aa-IL-6R se dializó frente a tampón de fosfato potásico 100 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 7,8, y la solución de proteína se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 15 mg/ml. Se disolvió N-succinimidil-3-acetilpropionato (SATP) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (pAb aa-IL-6R:SATP). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM y el exceso de SATP se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 2: preparación de inmunoglobulina G policlonal humana-MH

El anticuerpo policlonal humano se dializó frente a tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,4, y la solución de proteína seguidamente se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 25 mg/ml. Se disolvió éster de maleimidohexanoil-N-hidroxisuccinimida (MHS) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una proporción molar de 1:6 (IgG:MHS). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina hasta una concentración final de 10 mM, se ajustó el pH a 6,2 y el exceso de MHS se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 3: conjugación de pAb aa-IL-6R-SATP con inmunoglobulina policlonal humana G-MH

Se desacetiló pAb aa-IL-6R-SATP en pAb aa-IL-6R-SH mediante incubación con hidroxilamina 1 M al 2% (v/v), pH 7,5, y se incubó durante 45 min. a 25°C. El anticuerpo desacetilado se mezcló con inmunoglobulina G policlonal humana-MH (proporción molar de IgG-SH:IgG-MH=1:3) y se diluyó con tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1, hasta una concentración final de 1,5 mg/ml de pAb aa-IL-6R-SH y 4,5 mg/ml de inmunoglobulina G policlonal humana-MH. Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó a 25°C. Se analizó el proceso de conjugación utilizando una columna analítica de filtración en gel (por ejemplo TSK 3000). Se detuvo la conjugación generalmente tras 45 min. mediante la adición de cisteína hasta una concentración final de 1 mM. Tras 30 min. adicionales de incubación, se añadió N-metilmaleimida (NMM) hasta una concentración final de 5 mM y se ajustó el pH a 7,5. Tras 60 min. de incubación a 25°C, se purificó el conjugado mediante cromatografía de filtración en gel S300 con el fin de eliminar los anticuerpos no conjugados.

Preparación de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con inmunoglobulina M humana

Etapas 1: preparación de pAb de conejo aa-IL-6R-SATP

Se dializó el pAb aa-IL-6R frente a tampón de fosfato potásico 100 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 7,8, y la solución de proteína se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 15 mg/ml. Se disolvió N-succinimidil-3-acetilpropionato (SATP) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (pAb aa-IL-6R:SATP). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM y el exceso de SATP se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 2: preparación de inmunoglobulina M policlonal humana-MH

El anticuerpo policlonal humano se dializó frente a tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,4, y la solución de proteína obtenida se ajustó posteriormente a una concentración de proteína de aproximadamente 20 mg/ml. Se disolvió éster de maleimido-hexanoil-N-hidroxisuccinimida (MHS) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:50 (IgM:MHS). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina hasta una concentración final de 10 mM. Se ajustó el pH a 6,2 y el

exceso de MHS se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 3: conjugación de pAb aa-IL-6R-SATP con inmunoglobulina M policlonal humana-MH

Se desacetiló pAb aa-IL-6R-SATP en pAb aa-IL-6R-SH mediante incubación con hidroxilamina 1 M al 2% (v/v), pH 7,5, y se incubó durante 45 min. a 25°C. El anticuerpo desacetilado se mezcló con inmunoglobulina M policlonal humana-MH (proporción molar de pAb aa-IL-6R-SH:IgM-MH=1:2) y se diluyó con tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, pH 6,1, hasta una concentración final de aproximadamente 0,9 mg/ml de pAb aa-IL-6R-SH, y 9,1 mg/ml de inmunoglobulina M policlonal humana-MH. Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó a 25°C. Se realizó un seguimiento del proceso de conjugación utilizando una columna analítica de filtración en gel (por ejemplo TSK 5000). Se detuvo la reacción de conjugación generalmente tras 60 min. mediante la adición de cisteína a una concentración final de 1 mM. Tras 30 min. adicionales de incubación, se añadió N-metilmaleimida (NMM) hasta una concentración final de 5 mM y se ajustó el pH a 7,5. Tras 60 min. de incubación a 25°C, se purificó el conjugado mediante cromatografía de filtración en gel S400 para eliminar los anticuerpos no conjugados.

Preparación de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con inmunoglobulina E policlonal humana

Etapas 1: preparación de pAb de conejo aa-IL-6R-SATP

Se dializó el pAb aa-IL-6R frente a tampón de fosfato potásico 100 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 7,8, y la solución de proteína se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 15 mg/ml. Se disolvió N-succinimidil-3-acetilpropionato (SATP) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (pAb aa-IL-6R-SATP). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM y el exceso de SATP se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 2: preparación de inmunoglobulina E policlonal humana-MH

El anticuerpo policlonal humano se dializó frente a tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,4, y la solución de proteína obtenida se ajustó a una concentración de proteína final de aproximadamente 13 mg/ml. Se disolvió éster de maleimidohexanoil-N-hidroxisuccinimida (MHS) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:6 (IgE:MHS). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM, se ajustó el pH a 6,2 y el exceso de MHS se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 3: conjugación de pAb de conejo aa-IL-6R-SATP con inmunoglobulina E policlonal humana-MH

Se desacetiló pAb aa-IL-6R-SATP en pAb aa-IL-6R-SH mediante incubación con hidroxilamina 1 M al 2% (v/v), pH 7,5, y se incubó durante 45 min. a 25°C. El anticuerpo desacetilado se mezcló con inmunoglobulina E policlonal humana-MH (proporción molar de pAb aa-IL-6R-SH:IgE-MH=1:1,7) y se diluyó con tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1, hasta una concentración de 2,9 mg/ml de pAb aa-IL-6R-SH, y 6,3 mg/ml de inmunoglobulina E policlonal humana-MH. Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó a 25°C. Se realizó un seguimiento del proceso de conjugación con una columna analítica de filtración en gel (por ejemplo TSK 4000). Se detuvo el proceso de conjugación generalmente tras 90 min. mediante la adición de cisteína hasta una concentración final de 1 mM. Tras 30 min. adicionales de incubación, se añadió N-metilmaleimida (NMM) hasta una concentración final de 5 mM y se ajustó el pH a 7,5. Tras 60 min. de incubación a 25°C, se purificó el conjugado mediante cromatografía de filtración en gel S3000 con el fin de eliminar los anticuerpos no conjugados.

Preparación de un conjugado de pAb aa-IL-6R de conejo con inmunoglobulina A policlonal humana

Etapas 1: preparación de pAb de conejo aa-IL-6R-SATP

El pAb aa-IL-6R se dializó frente a tampón de fosfato potásico 100 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 7,8 y la solución de proteína se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 15 mg/ml. Se disolvió N-succinimidil-3-acetilpropionato (SATP) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (pAb aa-IL-6R-SATP). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM y el exceso de SATP se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 2: preparación de inmunoglobulina A policlonal humana-MH

El anticuerpo policlonal humano se dializó frente a tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,4, y la solución de proteína obtenida se ajustó a una concentración de proteína final de aproximadamente 13 mg/ml. Se disolvió éster de maleimidohexanoil-N-hidroxisuccinimida (MHS) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una

proporción molar de 1:6 (IgA:MHS). Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina a una concentración final de 10 mM, se ajustó el pH a 6,2 y el exceso de MHS se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1.

Etapas 3: conjugación de pAb de conejo aa-IL-6R-SATP con inmunoglobulina A policlonal humana-MH

Se desacetiló pAb aa-IL-6R-SATP en pAb aa-IL-6R-SH mediante incubación con hidroxilamina 1 M al 2% (v/v), pH 7,5, y se incubó durante 45 min. a 25°C. El anticuerpo desacetilado se mezcló con inmunoglobulina A policlonal humana-MH (proporción molar de pAb aa-IL-6R-SH:IgA-MH=1:2) y se diluyó con tampón de fosfato potásico 10 mM que contenía NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 6,1, hasta una concentración de 2,9 mg/ml de pAb aa-IL-6R-SH y 6,3 mg/ml de inmunoglobulina A policlonal humana-MH. Se ajustó el pH a 7,1 y la mezcla se incubó a 25°C. Se realizó un seguimiento del proceso de conjugación utilizando una columna analítica de filtración en gel (por ejemplo TSK 4000). Se detuvo el proceso de conjugación generalmente tras 90 min. mediante la adición de cisteína hasta una concentración final de 1 mM. Tras 30 min. adicionales de incubación, se añadió N-metilmaleimida (NMM) hasta una concentración final de 5 mM y se ajustó el pH a 7,5. Tras 60 min. de incubación a 25°C, se purificó el conjugado mediante cromatografía de filtración en gel S300 con el fin de eliminar los anticuerpos no conjugados.

Ejemplo 2

Acoplamiento de anticuerpos anti-IL-6R biotinilados con un chip recubierto con estreptavidina

El anticuerpo anti-IL-6R había sido dializado frente a tampón (tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 8,5). A continuación, se ajustó la solución a una concentración de proteína de 10 mg/ml. Se disolvió éster N-hidroxisuccinimida de ácido D-biotinil-aminocaproico en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5. Tras 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo de marcaje se eliminó mediante diálisis frente a tampón de fosfato potásico 25 mM complementado con cloruro sódico 150 mM, pH 7,5.

La superficie de una celda de flujo de un chip CM5 se activó con una mezcla de NHS-EDC en la primera etapa. Tras la activación de la superficie, se inyectó una solución de neutravidina 100 µg/ml /diluida en tampón a pH 4,5, Pierce) para permitir la formación de enlaces covalentes con los ésteres superficiales activados. A continuación, se llevó a cabo la inactivación de los ésteres no acoplados residuales mediante inyección de etanolamina 1 M. Se inyectó anticuerpo biotinilado sobre una única celda de flujo a un caudal de 20 µl/min. y una concentración de 20 µg/ml durante 5 minutos. Lo anterior condujo a la inmovilización del anticuerpo en la celda de flujo.

Ejemplo 3

Detección de anticuerpos de clase IgG anti-anticuerpo de IL-6R en suero humano

Se diluyó la muestra entre 1:10 y 1:100 y se inyectó en volúmenes de 20 µl a una caudal de 20 µl/min en un chip tal como se había preparado en el Ejemplo 2. Tras la inyección de la muestra, se inyectó el anticuerpo mAb de clase IgG anti-inmunoglobulina G humana a una caudal de 20 µl/min y a una concentración de 20 µg/ml. Finalmente, se llevó a cabo una inyección de solución de regeneración (H₃PO₄ 100 mM). Se midió una muestra de estándar al inicio de cada medición. Se inyectaron 20 µl de un conjugado de anticuerpo policlonal de conejo anti-anticuerpo anti-IL-6R (pAb aa-IL-6R) con IgG humana como estándar positivo sobre un chip de inmunogenicidad, con un anticuerpo completo inmovilizado, fragmento F(ab')₂ y/o fragmento Fc de anticuerpo anti-IL-6R a un caudal de 20 µl/min. Tras la inyección de estándar, opcionalmente se inyectó al mismo caudal el anticuerpo mAb anti-anticuerpos de clase IgG anti-inmunoglobulina G humana.

Ejemplo 4

Detección de anticuerpos de clase IgE anti-anticuerpo anti-IL-6R en suero humano

Se diluyó la muestra entre 1:10 y 1:100 y se inyectó en volúmenes de 20 µl a una caudal de 20 µl/min en un chip tal como se había preparado en el Ejemplo 2. Tras la inyección de la muestra, se inyectó el anticuerpo mAb de clase IgE anti-inmunoglobulina E humana a una caudal de 20 µl/min y a una concentración de 20 µg/ml. Finalmente, se llevó a cabo una inyección de solución de regeneración (H₃PO₄ 100 mM). Se midió una muestra de estándar al inicio de cada medición. Se inyectaron 20 µl de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con IgE humana a modo de estándar positivo sobre un chip de inmunogenicidad, con un anticuerpo completo inmovilizado, fragmento F(ab')₂ y/o Fc de anticuerpo anti-IL-6R a un caudal de 20 µl/min. Tras la inyección de estándar, opcionalmente se inyectó al mismo caudal el anticuerpo mAb anti-anticuerpo de clase IgE anti-inmunoglobulina E humana.

Ejemplo 5

Detección de anticuerpos de clase IgM anti-anticuerpo anti-IL-6R en suero humano

Se diluyó la muestra entre 1:10 y 1:100 y se inyectó en volúmenes de 20 µl a una caudal de 20 µl/min en un chip tal como se había preparado en el Ejemplo 2. Tras la inyección de la muestra, se inyectó el anticuerpo mAb anti-anticuerpo de clase IgM anti-inmunoglobulina M humana a un caudal de 20 µl/min y a una concentración de 20 µg/ml. Finalmente, se llevó a cabo una inyección de solución de regeneración (H₃PO₄ 100 mM). Se midió una muestra de estándar al inicio de cada medición. Se inyectaron 20 µl de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con IgM humana a modo de estándar positivo sobre un chip de inmunogenicidad, con un anticuerpo completo inmovilizado, fragmento F(ab')₂ y/o Fc de anticuerpo anti-IL-6R a un caudal de 20 µl/min. Tras la inyección de estándar, opcionalmente se inyectó al mismo caudal el anticuerpo mAb anti-anticuerpo de clase IgM anti-inmunoglobulina M humana.

Ejemplo 6

Detección de anticuerpos de clase IgE, IgG e IgM anti-anticuerpo anti-IL-6R en suero humano

Se diluyó la muestra entre 1:10 y 1:100 y se inyectó en volúmenes de 20 µl a una caudal de 20 µl/min en un chip tal como se había preparado en el Ejemplo 2. Tras la inyección de la muestra, se inyectó el anticuerpo mAb anti-anticuerpo de clase IgE anti-inmunoglobulina E humana a un caudal de 20 µl/min y a una concentración de 20 µg/ml. Tras la inyección, se registró la respuesta. A continuación, se inyectó el mAb anti-anticuerpo de clase IgM anti-inmunoglobulina M humana a un caudal de 20 µl/min y a una concentración de 20 µg/ml. Tras la inyección, se registró la respuesta. A continuación, se inyectó el anticuerpo anti-anticuerpo de clase IgG anti-inmunoglobulina G humana a un caudal de 20 µl/min y a una concentración de 20 µg/ml. Tras la inyección, se registró la respuesta. Finalmente, se llevó a cabo una inyección de solución de regeneración (H₃PO₄ 100 mM). Se midieron las tres muestras (conjugados) de estándar indicadas al inicio de cada medición. Estándar 1: se inyectaron 20 µl de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con IgM humana como estándar positivo sobre un chip de inmunogenicidad; estándar 2: se inyectaron 20 µl de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con IgE humana como estándar positivo sobre un chip de inmunogenicidad; estándar 3: se inyectaron 20 µl de un conjugado de pAb de conejo aa-IL-6R con IgG humana como estándar positivo sobre un chip de inmunogenicidad.

Ejemplo 7

Determinación mediante ELISA de anticuerpos de la clase IgE anti-anticuerpo parental utilizando un conjugado de estándar

En la primera etapa se unió anticuerpo biotinilado contra el receptor de IL-6 (anticuerpo parental) a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (MTP-SA). Se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavado con tampón universal. A continuación, las muestras y los estándares de referencia (anticuerpo de conejo contra anticuerpo anti-receptor de IL-6 conjugado con IgE policlonal humana) se añadieron a los diferentes pocillos y se incubaron. El anticuerpo anti-anticuerpo parental de la muestra y el estándar de referencia se unen al anticuerpo parental inmovilizado. Después de una etapa de lavado, el anticuerpo anti-anticuerpo parental unido y el estándar de referencia se detectaron con anticuerpo digoxigenilado contra IgE humana seguido de la incubación con anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado de anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS®. La señal se midió con un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Se determinaron los valores de absorbancia de cada muestra de suero por triplicado. Se obtuvo una señal positiva para el estándar y también para la muestra en el caso de que el anticuerpo anti-anticuerpo parental fuese de la subclase IgE (figuras 5 y 6).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjugado que comprende un anticuerpo antiidiotípico de unión específica a una región CDR de un anticuerpo monoclonal, que está destinado a la administración en mamíferos para la utilización en el tratamiento, terapia o diagnóstico de una enfermedad, y una inmunoglobulina de referencia de una clase de inmunoglobulina única en la que dicha inmunoglobulina de referencia es una inmunoglobulina humana o una región Fc de inmunoglobulina humana y en el que dicha inmunoglobulina de referencia no se une específicamente a dicho anticuerpo antiidiotípico y no se une específicamente a dicho anticuerpo, que está destinado a la administración en mamíferos para la utilización en el tratamiento, terapia o diagnóstico de una enfermedad.
- 10 2. Utilización de un conjugado según la reivindicación 1 a modo de estándar o control positivo en un inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo anti-anticuerpo parental en una muestra.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 2, caracterizada por que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo de tipo sándwich que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, en el que el anticuerpo de captura o trazador es dicho anticuerpo parental.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 2 o 3, caracterizada por que dicho anticuerpo anti-anticuerpo parental es un anticuerpo antiidiotípico contra dicho anticuerpo parental.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que dicho anticuerpo de captura se selecciona de entre el grupo que comprende la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada y un fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ o F(ab')₂ de dicho anticuerpo parental.

Fig. 1



Fig. 2

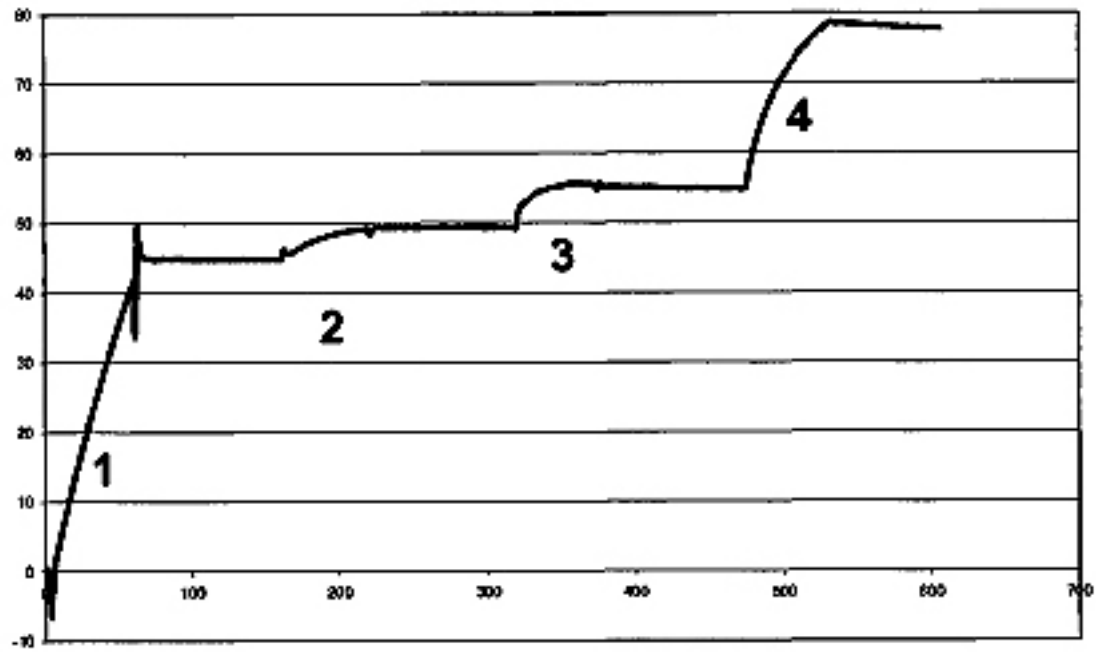


Fig. 3

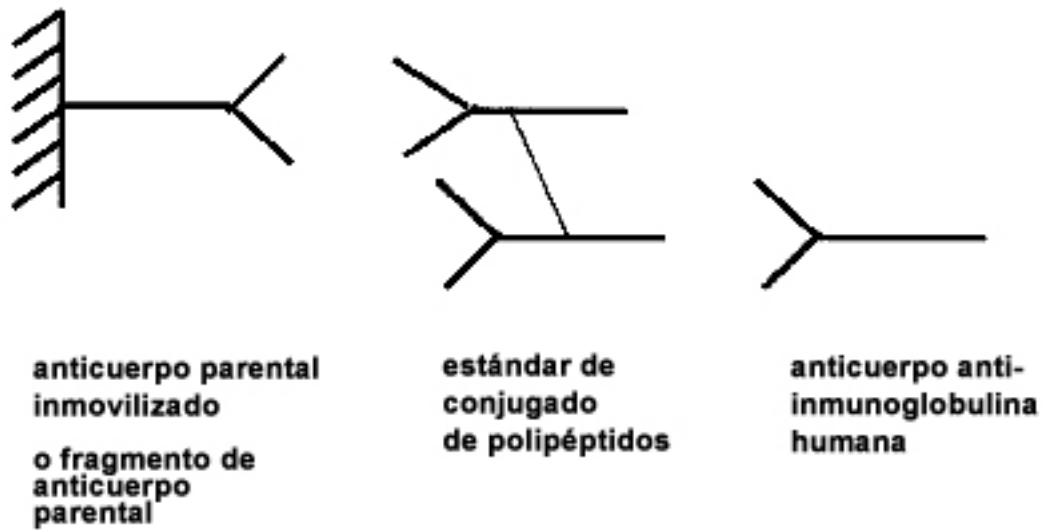


Fig. 4

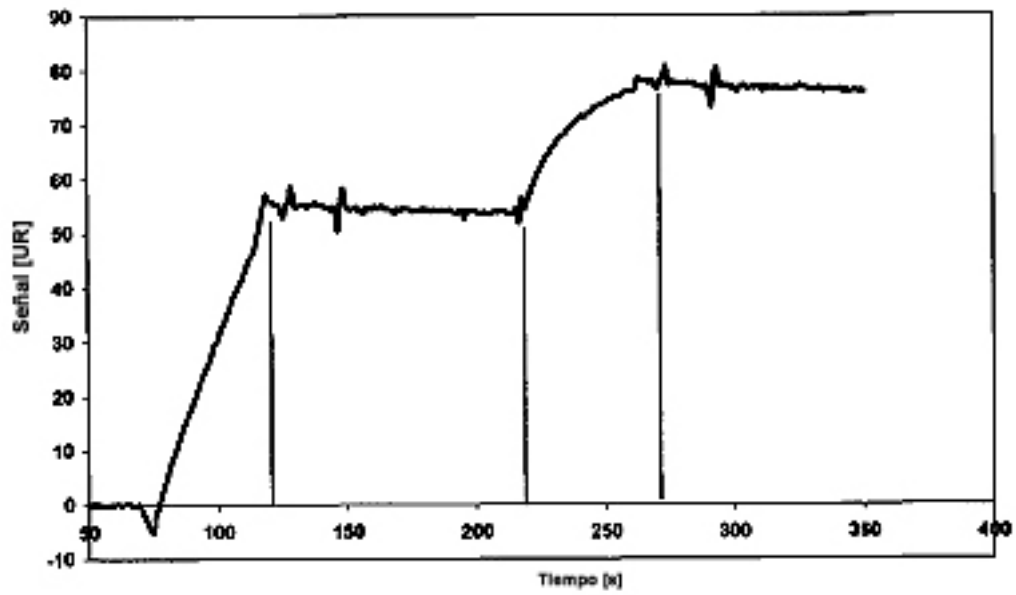


Fig. 5

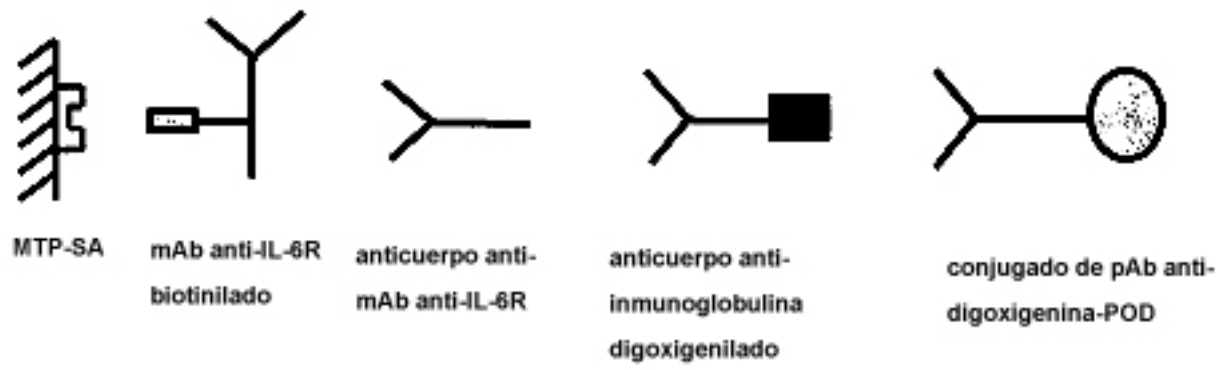


Fig. 6

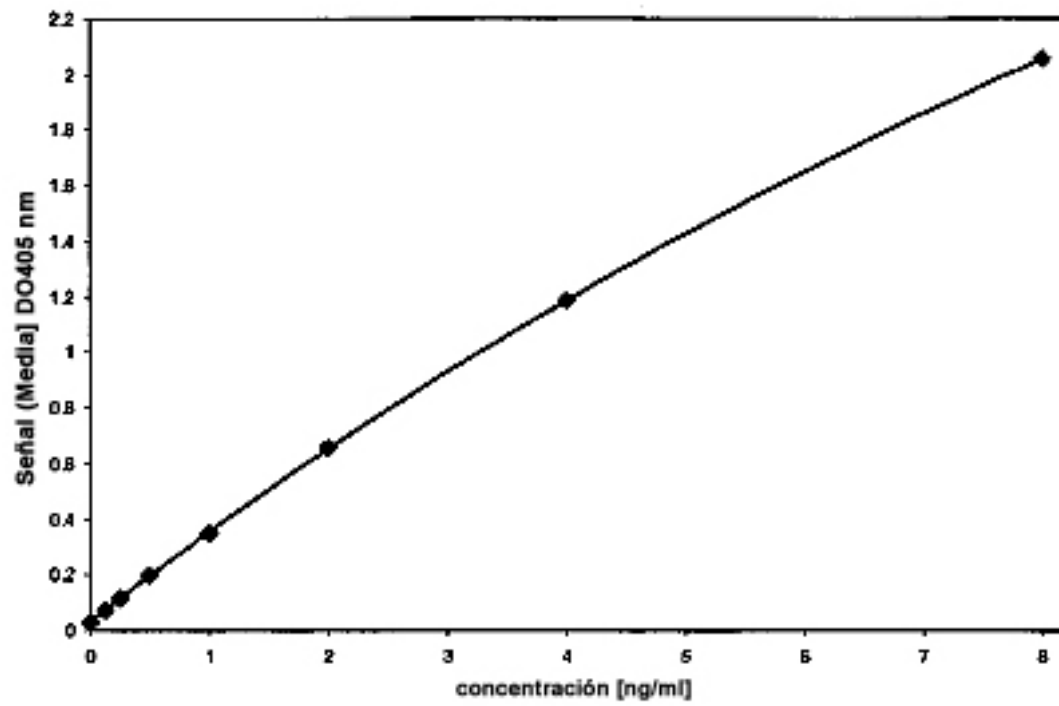


Fig. 7

