

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 579**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2010 E 10747844 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2470563**

54 Título: **Factor de velocidad**

30 Prioridad:

25.08.2009 EP 09010844

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

15.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHRAEML, MICHAEL y
VON PROFF, LEOPOLD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 577 579 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

Factor de velocidad

5 El factor de velocidad es la relación de las constantes de velocidad de asociación de los complejos de antígeno-anticuerpo determinadas a 37 °C y a 13 °C con lo que es posible clasificar anticuerpos, por ejemplo, como un aglutinante entrópico o entálpico sin la necesidad de determinaciones termodinámicas ni cálculos detallados.

Antecedentes de la invención

10 La generación de anticuerpos de alta afinidad que tienen una especificidad antigénica distinguida y una extraordinaria estabilidad del complejo con el antígeno es un importante objetivo en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico.

15 En lo que respecta a los análisis termodinámicos de las interacciones proteína-proteína, la tecnología imperante es el ensayo calorimétrico (Chaires, J. B., *Ann. Rev. Biophys.* 37 (2008) 135-51; Perozzo, R., *et al.*, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24(1-2) (2004) 1-52; Li, L., *et al.*, *Chem. Biol. Drug Des.* 71(6) (2008) 529-32; Liang, Y., *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai) 40(7) (2008) 565-76; Thielges, M. C., *et al.*, *Biochemistry* 47(27) (2008) 7237-47). La cantidad de muestra requerida para una determinación calorimétrica de la reacción es alta, tal como una concentración de anticuerpo de al menos 125 µg/ml y volúmenes de muestra de al menos 150 µl. Además, la calorimetría de la reacción requiere una alta pureza de la muestra y no tolera ninguna impureza en la muestra ni la heterogeneidad de la misma. Además, los tampones de la muestra influyen directamente en los resultados de los parámetros termodinámicos determinados. Es más, la calorimetría de la reacción solo puede resolver termodinámicas en el equilibrio.

25 La instrumentación de la resonancia de plasmón superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) (Roos, H., *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 11(1-6) (1998) 204-210; Van Regenmortel, M. H., *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 11(1-6) (1998) 163-167; Gunnarsson, K., *Curr. Protoc. Immunol.* Capítulo 18 (2001) Unidad 18.6; Drake, A. W., *et al.*, *Anal. Biochem.* 328(1) (2004) 35-43; Kikuchi, Y., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 100 (3) (2005) 311-7), permite la determinación rápida de perfiles cinéticos dependientes de la temperatura con un alto rendimiento (véase, por ejemplo, Canziani, G. A., *et al.*, *Anal. Biochem.* 325 (2004) 301-307; Safsten, P., *et al.*, *Anal. Biochem.* 353 (2006) 181-190; Leonard, P., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 323 (2007) 172-9).

35 Wassaf, D., *et al.* (*Anal. Biochem.* 351 (2006) 241-253) informan de la clasificación por afinidad de alto rendimiento de anticuerpos usando micromatrices de resonancia de plasmón superficial. En Roos, H., *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 11 (1998) 204-210, se informa de un análisis termodinámico de las interacciones de las proteínas con tecnología de biosensores.

40 Wark, K. L., *et al.* (*Adv. Drug. Deliv. Rev.* 58 (2006) 657-670) informan de tecnologías de mejora de la afinidad de los anticuerpos. Papalia, G. A., *et al.*, en *Anal. Biochem.* 359 (2006) 112-119, han informado de la caracterización de alta resolución de las interacciones entre fragmento de anticuerpo y antígeno usando BIAcore T100. Sagawa, T., *et al.* (*Mol. Immunol.* 39 (2003) 801-808) informan de aspectos termodinámicos y cinéticos de la evolución de los anticuerpos durante la respuesta inmune hacia el hapteno. Jason-Moller, L., *et al.*, en *Curr. Prot. Prot. Sci.* (2006) página unidad 19.13, han publicado una visión general de los sistemas BIAcore y su aplicación. Gelb, W., informa de métodos microcalorimétricos para estudios de péptidos (*Proc. 4th Int. Peptide Sympos.* (2007) página 1).

Sumario de la invención

50 Se ha encontrado que, para la caracterización de los anticuerpos, no se requiere una caracterización cinética completa, sino que, además, se requiere la determinación de la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C. La relación entre las mismas se puede usar para clasificar los anticuerpos de acuerdo con sus propiedades de unión.

55 El primer aspecto del que se informa en el presente documento es un método de selección de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una multitud de anticuerpos;
- b) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 37 °C y la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 13 °C como los datos de cinética dependiente de la temperatura;
- c) calcular la relación entre la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C para todos los anticuerpos proporcionados;
- d) seleccionar un anticuerpo con un factor de velocidad de 10 o inferior.

65 En una realización, el factor de velocidad es de 0 a 10. En otra realización, la determinación de los datos de cinética dependiente de la temperatura se realiza por resonancia de plasmón superficial. En una realización adicional, el

método es un método de alto rendimiento. En otra realización más, la selección se realiza mediante el factor de velocidad y mediante el valor de ΔS^\ddagger as. En una realización, en la resonancia de plasmón superficial, el antígeno se inmoviliza sobre la microplaca de resonancia de plasmón superficial. En una realización adicional, los datos de cinética dependiente de la temperatura son datos en el equilibrio termodinámico y datos termodinámicos en el estado de transición. En otra realización más, los datos de cinética dependiente de la temperatura se calculan con las formas lineales de las ecuaciones de van't Hoff, Eyring y Arrhenius. En una realización, se selecciona un anticuerpo con un ΔS^\ddagger as inferior a 200 J/mol*K (ΔS^\ddagger as < 200 J/mol*K). En una realización, se selecciona un anticuerpo con un ΔS^\ddagger as en el intervalo de -200 J/mol*K a 200 J/mol*K. En una realización adicional, se selecciona un anticuerpo con un ΔS^\ddagger as en el intervalo de -150 J/mol*K a +100 J/mol*K. En otra realización, la resonancia de plasmón superficial es con el tampón de HBS-EP suplementado con 1 mg/ml de carboximetildextrano. En otra realización más cada uno de los anticuerpos es producido por un solo hibridoma o linfocito B.

Un aspecto adicional del que se informa en el presente documento es un método de producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una multitud de células productoras de anticuerpos;
- b) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 37 °C y la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 13 °C como los datos de cinética dependiente de la temperatura;
- c) calcular la relación entre la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C para todos los anticuerpos proporcionados;
- d) seleccionar una célula productora de anticuerpo que produzca un anticuerpo con una relación de 10 o inferior;
- e) cultivar la célula seleccionada;
- f) recuperar el anticuerpo de la célula seleccionada cultivada o del medio de cultivo de la misma, produciendo de ese modo un anticuerpo.

En una realización, las células productoras de anticuerpos se depositan como células individuales. En una realización adicional, las células individuales depositadas se cultivan antes de la selección. En otra realización, el anticuerpo se purifica antes de la selección. En una realización adicional, el anticuerpo se purifica después de la recuperación. En una realización específica, la purificación se realiza mediante cromatografía de Proteína A.

Otro aspecto del que se informa en el presente documento es un método de selección de una forma humanizada de un anticuerpo parental que comprende:

- a) proporcionar un anticuerpo parental;
- b) proporcionar un conjunto de formas humanizadas del anticuerpo parental;
- c) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 37 °C y la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 13 °C como los datos de cinética dependiente de la temperatura para todos los anticuerpos proporcionados;
- d) calcular la relación entre la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C para todos los anticuerpos proporcionados;
- e) comparar la relación de las formas humanizadas con el factor de velocidad del anticuerpo parental;
- f) seleccionar una forma humanizada de un anticuerpo parental mediante la selección de un anticuerpo con una relación que sea inferior al doble de la relación del anticuerpo parental.

En una realización, la selección es de una forma humanizada con una relación que es inferior al 125 % de la relación del anticuerpo parental; en otra realización, es inferior al 110 % de la relación del anticuerpo parental.

En el presente documento, se informa del uso de un anticuerpo seleccionado con un método como el presentado en el presente documento como agente terapéutico o de diagnóstico. En el presente documento, se informa de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo obtenido con un método como el presentado en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

Los métodos presentados en el presente documento se basan en la determinación del factor de velocidad. Los anticuerpos se pueden clasificar basándose en el factor de velocidad, es decir, los anticuerpos se pueden caracterizar en función de sus propiedades de unión como, por ejemplo, aglutinante antigénico entrópico o entálpico. Se ha encontrado que una clasificación basada en el factor de velocidad no requiere la determinación ni/o el cálculo de la termodinámica detallada, reduciéndose así la cantidad de parámetros que se han de determinar y el número de cálculos que se han de realizar. El factor de velocidad es la relación de las constantes de velocidad de asociación del complejo de antígeno-anticuerpo (K_a) determinada independientemente a 37 °C y a 13 °C. Como solo se requieren dos determinaciones experimentales para calcular el factor de velocidad, es un método adecuado, rápido y de alto rendimiento.

El factor de velocidad se puede usar, por ejemplo, para comparar un anticuerpo humanizado con el anticuerpo

parental del que se obtiene. También se puede usar para evaluar los anticuerpos directamente del hibridoma y/o de sobrenadantes de linfocitos B. Esto no requiere una purificación preliminar, pues la determinación se puede realizar directamente con el sobrenadante en bruto.

5 Los métodos cinéticos basados en la resonancia de plasmón superficial tienen varias ventajas frente a los ensayos calorimétricos convencionales:

- es posible un procesamiento de alto rendimiento;
- bajo consumo de la muestra;
- 10 - medida de la afinidad en lugar de la avidéz; y
- uso de sobrenadantes celulares en bruto o mezclas de cultivo del complejo.

15 La superficie del biosensor de plasmón superficial es una matriz de afinidad, que se usa, por ejemplo, para capturar el anticuerpo de los sobrenadantes del cultivo celular en bruto. Por tanto, se pueden usar como muestras las mezclas en bruto y de complejo. Como una de las parejas de interacción se inmoviliza sobre la superficie del sensor y el segundo compuesto se inyecta en el sistema de flujo, es posible medir la termodinámica en el equilibrio y en el estado de transición, puesto que el sistema FIA (análisis de inyección de flujo) permite y puede monitorizar por separado la fase de asociación y de disociación del complejo.

20 Con esta tecnología, es posible calcular los parámetros termodinámicos:

- entalpía de unión estándar libre ΔG° ,
- entalpía de unión estándar ΔH° ,
- 25 - entropía de unión estándar ΔS° ,

y los parámetros en el estado de transición:

- entalpía de asociación estándar libre $\Delta G^\circ \ddagger_{as}$,
- entalpía de asociación estándar $\Delta H^\circ \ddagger_{as}$,
- 30 - entropía de asociación estándar $\Delta S^\circ \ddagger_{as}$,
- energía de activación E_{aas} ,
- energía de disociación estándar libre $\Delta G^\circ \ddagger_{dis}$,
- entalpía de disociación estándar $\Delta H^\circ \ddagger_{dis}$,
- entropía de disociación estándar $\Delta S^\circ \ddagger_{dis}$ y
- 35 - energía de disociación E_{adis} .

En caso de usar la ecuación de van't Hoff no lineal, también se puede determinar un valor de ΔC_p .

40 En general, una detección cinética de anticuerpos basada en SPR (véase, por ejemplo, Steukers, M., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 310 (2006) 126-135; Rich, R. L., *et al.*, *Anal. Biochem.* 361 (2007) 1-6) resulta satisfactoria mediante una segunda etapa de análisis SPR termodinámicos de mayor resolución.

45 Se cultivan células productoras de anticuerpos, y los sobrenadantes de los cultivos celulares producidos se someten, en una realización, a análisis de alto rendimiento, en los que se generan datos cinéticos dependientes de la temperatura para calcular el factor de velocidad y las propiedades termodinámicas en el estado de transición (TS). La selección del anticuerpo de acuerdo con el método presentado en el presente documento se realiza basándose en su comportamiento termodinámico.

50 El anticuerpo de alta afinidad se caracteriza por una aceleración dependiente de la temperatura de la constante de velocidad de asociación del complejo con el antígeno $k_a[1/Ms]$ y una constante de velocidad de disociación del complejo con el antígeno restante o desacelerada $k_d[1/s]$. Sorprendentemente, dicho anticuerpo se caracteriza por un mecanismo de interacción con el antígeno que muestra una gran variación de la entropía en el equilibrio de unión. Por lo tanto, se puede llevar a cabo una evaluación de riesgos mediante otros medios distintos de la calorimetría para determinar el efecto del que procede la contribución entrópica. Desde la fase de asociación del complejo, que es arriesgada debido a la promiscuidad de la unión al antígeno, o desde la fase de disociación del complejo, que solo indica una interacción del antígeno del complejo, que comprende un cambio conformacional potencialmente inducido del antígeno. En una realización, la contribución entrópica procede de la etapa de disociación del complejo de anticuerpo-antígeno, en la que tiene lugar una gran variación positiva o una gran variación negativa de la entropía de disociación $\Delta S^\circ \ddagger_{dis}$.

60 Además, un anticuerpo de alta afinidad puede tener una anomalía termodinámica procedente de la fase de disociación del antígeno, en la que la constante de velocidad de disociación $k_d[1/s]$ disminuye de forma sorprendente e inesperada al aumentar la temperatura. Dicho anticuerpo se caracteriza por parámetros termodinámicos tales como: i) una fase de disociación que muestra una energía de activación de disociación negativa o casi nula E_{adis} [kJ/mol]; ii) una entalpía de disociación negativa $\Delta H^\circ \ddagger_{dis}$ [kJ/mol]; e iii) una gran entropía de disociación negativa $\Delta S^\circ \ddagger_{dis}$ [kJ/mol]. Cabe señalar que se trata de un tratamiento completamente teórico de

este efecto, y que no se debe considerar una limitación. Por lo tanto, en una realización, se determinan la energía de activación de disociación E_{adis} , la entalpía de disociación ΔH°_{dis} y la entropía de disociación ΔS°_{dis} , y se selecciona un anticuerpo que tiene i) una energía de activación de disociación negativa o casi nula E_{adis} [kJ/mol]; ii) una entalpía de disociación negativa ΔH°_{dis} [kJ/mol]; e iii) una gran entropía de disociación negativa ΔS°_{dis} [kJ/mol].

Por lo tanto, un método como el presentado en el presente documento permite la selección de un anticuerpo de una multitud de anticuerpos de alta afinidad, basándose en el factor de velocidad y el valor de ΔS°_{dis} .

Se pueden cultivar clones depositados en células individuales antes de la detección como en una realización en matraces de cultivo spinner de 100 ml usando medio RPMI 1640. En otra realización, los anticuerpos se purifican a partir del sobrenadante mediante cromatografía en columna de proteína A Sepharose™ antes de la determinación de los datos cinéticos dependientes de la temperatura, es decir, de la detección termodinámica. En una realización, el tampón del sistema es HBS-EP para la detección termodinámica. En otra realización, el tampón de muestra se complementa con carboximetildextrano a 1 mg/ml para reducir los efectos inespecíficos de la matriz del sensor.

La mayoría de las publicaciones que usan medidas basadas en SPR no usan sistemas de captura de anticuerpos como tecnología de presentación de sensores de superficie. Normalmente, el anticuerpo o los fragmentos del mismo se inmovilizan covalentemente sobre el sensor. Esta tecnología no se puede usar en un formato de alto rendimiento, pues la superficie no es adecuada para la presentación polivalente de anticuerpos, sino que está limitada técnicamente por el número de sensores que se inmovilizan con ligandos.

Para realizar una detección termodinámica se ha de establecer un sistema de captura específico de la especie con una estabilidad apropiada del complejo de anticuerpo secundario dependiente de la temperatura. El biosensor se ha de calibrar mediante un procedimiento de optimización para determinar las características de unión de los anticuerpos con especificidades de epitopo variables en un formato de alto rendimiento. La detección termodinámica proporciona un conjunto de datos dependientes de la temperatura (véase la Figura 3). A temperaturas más bajas, se observa una menor respuesta, pues se reduce la velocidad de asociación del sistema de captura (véase el Ejemplo 5). A temperaturas más altas, la velocidad de asociación aumenta.

Además, se ha encontrado que, a temperaturas por debajo de 13 °C, la cinética de asociación del sistema de captura es demasiado lenta para una respuesta suficiente del anticuerpo. Por debajo de 13 °C y por encima de 37 °C, la determinación de la cinética de unión al antígeno del anticuerpo proporciona datos no linealizables de acuerdo con las ecuaciones de van't Hoff, Eyring y Arrhenius.

En una realización, la detección termodinámica se realiza a temperaturas de 13 °C o 17 °C y 37 °C. Se ha encontrado que, en este intervalo de temperaturas, es posible realizar un cálculo sencillo de los datos de equilibrio termodinámico de acuerdo con la forma lineal de la ecuación de van't Hoff y un cálculo sencillo de la termodinámica del estado de transición de acuerdo con la ecuación lineal de Eyring y la ecuación lineal de Arrhenius (Wear, M. A., *et al.*, *Anal. Biochem.* 359 (2006) 285-287; véase también la Figura 5). En una realización, todas las mediciones se realizan en las mismas condiciones para realizar una detección de alto rendimiento (HTS) responsable.

Para el cálculo, se pueden usar las siguientes fórmulas:

a) Ecuación de Arrhenius:

$$(I) \quad k = A * e^{(-E_a/R * T)}$$

b) Cálculos de van't Hoff:

$$(II) \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T * \Delta S^\circ$$

$$(III) \quad \Delta G^\circ = - R * T * \ln K_D$$

$$(IV) \ln K_D = -1/T * (\Delta H^\circ/R)/ \text{pendiente} + (\Delta S^\circ/R)/\text{intersección}$$

$$(V) R*T*\ln K_D = \Delta H^\circ_{T0} - T*\Delta S^\circ_{T0} + \Delta C_p^\circ(T-T_0) - T*\Delta C_p^\circ \ln(T/T_0)$$

c) Fase de asociación de Eyring:

$$(VI) k_a = (k_b * T/h) * e^{(-\Delta G^\ddagger/R*T)}$$

$$(VII) \ln k_a/T = -1/T * (\Delta H^\circ_{\ddagger}/R)/ \text{pendiente} + (\Delta S^\circ_{\ddagger}R + \ln k_b/h)/\text{intersección}$$

$$(VIII) k_a = A * e^{-E_a/R*T}$$

$$(IX) \ln k_a = \ln A/ \text{Intersección} - (1/T * E_a/R)/\text{pendiente}$$

5 d) Fase de disociación de Eyring:

$$(X) k_d = (k_b * T/h) * e^{(-\Delta G^\ddagger/R*T)}$$

$$(XI) \ln k_d/T = -1/T * (\Delta H^\circ_{\ddagger}/R)/ \text{pendiente} + (\Delta S^\circ_{\ddagger}/R + \ln k_b/h)/\text{intersección}$$

$$(XII) k_d = A * e^{-E_a/R*T}$$

$$(XIII) \ln k_d = \ln A/ \text{Intersección} - (1/T * E_a/R)/\text{pendiente}$$

con

- 10 ΔH° - entalpía de unión estándar,
 ΔS° - entropía de unión estándar,
 ΔG° - entalpía de unión estándar libre,
 $T*\Delta S^\circ$ - término entrópico,
15 $\Delta H^\circ_{\ddagger as}$ - entalpía de unión de asociación estándar,
 $\Delta S^\circ_{\ddagger as}$ - entropía de unión de asociación estándar,
 $\Delta G^\circ_{\ddagger as}$ - entalpía de unión libre de asociación estándar,
 E_{aas} - parámetro de Arrhenius para la asociación,
 $\Delta H^\circ_{\ddagger dis}$ - entalpía de unión de disociación estándar,
 $\Delta S^\circ_{\ddagger dis}$ - entropía de unión de disociación estándar,
20 $\Delta G^\circ_{\ddagger dis}$ - entalpía de unión libre de disociación estándar,
 E_{adis} - parámetro de Arrhenius para la disociación,
 K_D - constante de afinidad,
 k_a - constante de velocidad de asociación,
 k_b - constante de Boltzmann = $(1,3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1})$,
25 k_d - constante de velocidad de disociación,
 h - constante de Planck,
 C_p - capacidad calorífica molar.

La dependencia de la temperatura de la entalpía de unión libre ΔG° se puede calcular para cada temperatura en el

intervalo de 13 °C a 37 °C con la fórmula $\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K_D$. Si el valor es constante, se puede usar la forma lineal de la ecuación de van't Hoff. Si ΔG° varía, se prefiere la forma no lineal.

5 Los datos obtenidos en la detección termodinámica se pueden visualizar en una representación logarítmica doble como la representada en la Figura 6 a), en la que las constantes de velocidad cinéticas (k_{as}) k_a [1/MS] y (k_{dis}) k_d [1/s] se indican en el eje X y eje Y, respectivamente. Las líneas isométricas (líneas continuas) indican las zonas de las mismas afinidades, que se representan en negrita a la derecha del diagrama. Dado que el cociente de k_d/k_a proporciona la constante de equilibrio K_D [M], cada punto de datos es equivalente a una afinidad a una temperatura respectiva. La flecha superior simboliza el gradiente de temperatura en las etapas de +4 °C, comenzando a 13 °C o 10 17 °C, respectivamente, y terminando a 37 °C. Las tendencias de la afinidad dependiente de la temperatura de cada anticuerpo están conectadas por una línea.

15 En la Figura 6 b), se muestran tres tendencias de afinidad ilustrativas. En este mapa de velocidades, se muestran las K_D en las etapas de +4 °C de tres anticuerpos ilustrativos, en el que uno es un anticuerpo con una afinidad creciente al aumentar la temperatura; otro es un anticuerpo con afinidad constante al aumentar la temperatura; y otro es un anticuerpo con una afinidad decreciente al aumentar la temperatura. La mayoría de los anticuerpos muestran una pérdida de afinidad debido a una falta de estabilidad del complejo con el antígeno (como los representados por el recuadro de la Figura 6 b)). La afinidad permanece constante cuando k_{as} y k_{dis} aumentan (círculos). Un anticuerpo terapéutico o de diagnóstico muestra preferentemente un aumento de k_{as} y k_{dis} al aumentar la temperatura, o muestra 20 una aceleración de k_{as} y una deceleración de k_{dis} . Asimismo, la afinidad aumenta y el complejo gana estabilidad a temperaturas superiores (círculos negros).

25 La monitorización de la cinética dependiente de la temperatura como se muestra en la Figura 6 es la base para la selección de anticuerpos con una estabilidad del complejo con antígeno independiente de la temperatura o que aumenta con la temperatura.

30 La Figura 7 muestra a modo de ejemplo dos cinéticas diferentes dependientes de la temperatura de dos formas de anticuerpos 1 y 2, que se pueden obtener en un proceso de humanización. En dicho proceso, se pueden usar diferentes combinaciones de secuencias basadas en la cadena pesada y en la cadena ligera de la línea germinal humana para reemplazar secuencias marco de anticuerpo parental murino. El objetivo es seleccionar anticuerpos humanizados monoclonales (mAb), preferentemente, con termodinámica, especificidades y estabildades invariables, en comparación con el anticuerpo parental. Se puede observar que el anticuerpo 2, en contraste con el anticuerpo 1, aumenta enormemente su constante de velocidad de asociación k_a en el gradiente de temperatura dado.

35 Ambos anticuerpos se unen al antígeno a 37 °C con afinidad similar, por lo que la afinidad no es un parámetro de selección adecuado para diferenciar los anticuerpos.

40 Dado que ambos anticuerpos difieren mucho en sus contribuciones entrópicas, un parámetro de selección adicional mucho mejor es ΔS^\ddagger_{as} . Por ejemplo, la forma de anticuerpo humanizado 1 muestra una $\Delta S^\ddagger_{as} = 70 \pm 15$ J/mol*K (ecuación de Eyring, $R^2 = 0,9601$) y la forma de anticuerpo humanizado 2 muestra una entropía de unión de $\Delta S^\ddagger_{as} = 350 \pm 70$ J/mol*K (ecuación de Eyring, $R^2 = 0,9530$). La entropía de unión superior de la forma de anticuerpo humanizado 2 se refleja en una fuerte aceleración de la constante de velocidad de asociación k_a en el gradiente de temperatura de 13 °C a 37 °C.

45 Se ha encontrado que la aceleración de la formación del complejo de anticuerpo-antígeno por un aumento de la temperatura, respectivamente, el aumento de la constante de la velocidad de asociación k_a a temperatura elevada, se correlaciona con la entropía de la fase de asociación de anticuerpo-antígeno ΔS^\ddagger_{as} .

50 Se cuantificaron termodinámicamente las interacciones de unión al antígeno de 28 anticuerpos. Se calcularon la entropía de la fase de asociación ΔS^\ddagger_{as} y el factor de velocidad FV ($k_a(37\text{ °C})/k_a(13\text{ °C})$) (véase la Tabla 1).

Tabla 1: ΔS^\ddagger_{as} de 28 anticuerpos calculados de acuerdo con la ecuación de Eyring; todos los valores muestran $R^2 > 95\%$. EE: Error de cálculo. FV: factor de velocidad.

anticuerpo	antígeno	FV	ΔS^\ddagger_{as} [J/mol*K]	EE [J/mol*K]
anticuerpo 3	4	2	-85	7
anticuerpo 4	5	2	-53	5,1
anticuerpo 5	3	2	-77	5,4
anticuerpo 6	4	2	-73	6,9
anticuerpo 7	4	2	-83	1,2
anticuerpo 8	2	3	-18	3,5

anticuerpo	antígeno	FV	$\Delta S^\circ\ddagger$ as [J/mol*K]	EE [J/mol*K]
anticuerpo 9	2	3	-10	5,8
anticuerpo 10	5	3	-66	14
anticuerpo 11	1	2	-35	4,1
anticuerpo 12	5	2	-38	13
anticuerpo 13	1	5	-14	1,3
anticuerpo 14	2	5	9	6,6
anticuerpo 15	1	5	-5,3	5,6
anticuerpo 16	1	6	71	23
anticuerpo 17	2	8	77	15
anticuerpo 18	2	9	80	16
anticuerpo 19	2	12	110	29
anticuerpo 20	2	21	160	41
anticuerpo 21	2	74	350	70
anticuerpo 22	2	137	370	78
anticuerpo 23	2	4	6	5,5
anticuerpo 24	2	4	3,6	4,2
anticuerpo 25	2	5	26	9,2
anticuerpo 26	6	5	38	13
anticuerpo 27	2	5	24	6,3
anticuerpo 28	2	6	34	12
anticuerpo 29	2	6	28	12
anticuerpo 30	6	7	62	14
anticuerpo 31	2	8	77	15

La Tabla 1 muestra los datos de 28 anticuerpos murinos, quiméricos humanos y murinos humanizados diferentes, fragmentos Fab y Fab'2 de origen murino o humano, la unión a seis antígenos diferentes. Los antígenos son todos antígenos proteinógenos, conformacionales, que difieren en su peso molecular. El factor de velocidad FV se correlaciona con $\Delta S^\circ\ddagger$ as, por lo que los valores bajos de FV se correlacionan con valores negativos o bajos de $\Delta S^\circ\ddagger$ as. Se ha encontrado que una $\Delta S^\circ\ddagger$ as negativa indica una interacción entre anticuerpo y antígeno dirigida por la entalpía, los valores de $\Delta S^\circ\ddagger$ as positivos indican interacciones entrópicas/entálpicas y los valores de $\Delta S^\circ\ddagger$ as de tres dígitos significan interacciones dirigidas completamente por la entropía. Por lo tanto, en el presente documento, se informa de un método de selección de un anticuerpo que se une específicamente que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una multitud de anticuerpos;
- b) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo a su antígeno a 37 °C y la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo a su antígeno a 13 °C;
- c) calcular la relación de la constante de velocidad de asociación a 37 °C con respecto a la constante de velocidad de asociación a 13 °C;
- d) seleccionar un anticuerpo que se une específicamente mediante la selección de un anticuerpo con una relación de 10 o inferior y un valor de $\Delta S^\circ\ddagger$ as de 100 J/mol*K o inferior.

En una realización, la selección es de un anticuerpo con un valor de $\Delta S^\circ\ddagger$ as de 50 J/mol*K o inferior.

Cuanto mayor es la $\Delta S^\circ\ddagger$ as, mayor es la probabilidad de la unión promiscua del anticuerpo.

Una $\Delta S^\circ\ddagger$ as baja o negativa se correlaciona con especificidad y con unión mono-específica.

Se ha encontrado que no es necesario determinar la termodinámica de la fase de asociación mediante la linealización de los datos de acuerdo con las ecuaciones de Eyring y de Arrhenius, cuando la tarea consiste en producir datos de alta calidad linealizables para calcular los parámetros con errores aceptables. Usando los métodos como se informa en el presente documento, basta con determinar los datos cinéticos a solo dos temperaturas, es decir, a 13 °C y a 37 °C.

Basándose en los datos experimentales, se determinan los valores de k_a (37 °C) y k_a (13 °C) mediante el uso de un modelo cinético apropiado. A partir de entonces, se calcula el factor de velocidad (FV) = k_a (37 °C)/ k_a (13 °C), y se evalúa la ΔS^\ddagger de acuerdo con la curva característica presentada en la Figura 8.

Los valores de FV de dos dígitos se correlacionan con los valores de ΔS^\ddagger de tres dígitos, e indican un mayor riesgo de unión promiscua. Los datos de la Figura 8 se modelizaron mediante una función de asociación exponencial $y = y_0 + A1 * (1 - \exp(-x/t1)) + A2 * (1 - \exp(-x/t2))$.

De acuerdo con la gráfica de la ecuación exponencial, se puede reducir al mínimo el riesgo de seleccionar un aglutinante dirigido por la entropía no deseado. La ΔS^\ddagger se estima mediante el parámetro sustituto FV. En contraste con ΔS^\ddagger , FV es un parámetro de acceso instrumentalmente fácil.

La Figura 8 muestra que la ΔS^\ddagger alcanza un valor de meseta en el parámetro de la ecuación $A1 = 399,74088 \pm 36,60886$ J/mol*K.

Los datos más relevantes se caracterizan por valores bajos de FV de menos de 10, y muestran desviaciones estándar de ΔS^\ddagger menores.

El parámetro de ajuste $A2$ ($A2 = 198,50729 \pm 29,933$ J/mol*K) es ΔS^\ddagger en la inflexión de la curva.

Los anticuerpos con ΔS^\ddagger superior a $A2$ ($\Delta S^\ddagger > A2$) son críticos, es decir, no se adaptan bien, para esfuerzos de procesamiento adicionales. La Figura 8 indica que la mayoría de los anticuerpos analizados muestran valores de FV inferiores a 10 (<10). Estos anticuerpos se pueden usar diagnóstica o farmacéuticamente.

Los anticuerpos con ΔS^\ddagger superior a $A2$, que se correlaciona con un FV de más de 50, muestran, por ejemplo, reactividad cruzada con otros antígenos.

Por lo tanto, en el presente documento, se informa de un método de selección de un anticuerpo de reacción cruzada que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una multitud de anticuerpos;
- b) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo a su antígeno a 37 °C y la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo a su antígeno a 13 °C;
- c) calcular la relación de la constante de velocidad de asociación a 37 °C con respecto a la constante de velocidad de asociación a 13 °C;
- d) seleccionar un anticuerpo de reacción cruzada mediante la selección de un anticuerpo con una relación de 50 o superior y un valor de ΔS^\ddagger de 200 J/mol*K o superior.

En una realización, la selección es de un anticuerpo con un valor de ΔS^\ddagger de 300 J/mol*K o superior.

La Figura 8 se puede segmentar en cuatro corredores (véase la Figura 9). Los factores $0 < FV < 20$ indican un resultado de detección seleccionado. Los anticuerpos del segmento 3 muestran factores FV de más de 20 ($FV > 20$) y no se seleccionan debido a sus valores de ΔS^\ddagger aumentados.

Estos anticuerpos son sospechosos de unirse de forma promiscua al antígeno, y requieren análisis más detallados para aclarar el mecanismo de unión a la diana.

La clasificación de acuerdo con la Figura 9 se puede usar para realizar ensayos de detección de alto rendimiento basados en ΔS^\ddagger de grandes poblaciones de anticuerpos. Por ejemplo, en el proceso de humanización de anticuerpos, en el que se ensayan sistemáticamente las composiciones óptimas de cadena pesada y ligera humana para determinar su rendimiento óptimo, de manera similar al anticuerpo parental, se puede usar el método del que se informa en el presente documento.

Los anticuerpos 8, 9, 17, 18, 20, 21, 22 y 31 como los comprendidos en la Tabla 1 corresponden a diferentes etapas de un proceso de humanización. A los valores del FV, le puede seguir el proceso de humanización. El anticuerpo murino parental 8 muestra un bajo valor de FV y una ΔS^\ddagger negativa. El anticuerpo quimérico 9 muestra un FV todavía invariable, así como ΔS^\ddagger . Los anticuerpos totalmente humanizados, que son de diferentes combinaciones de secuencias de cadenas VLNH, muestran discrepancias en el FV y, por tanto, en la ΔS^\ddagger . Finalmente, se seleccionó el anticuerpo 31, que muestra el FV más bajo, así como ΔS^\ddagger , mientras que el anticuerpo 21 y el anticuerpo 20 no se seleccionaron debido a la inestabilidad termodinámica, la funcionalidad inferior en ensayos de

cultivo celular y/o la unión promiscua al antígeno.

La Tabla 1 indica que el diagrama que se muestra en la Figura 9 también se puede usar para fragmentos de anticuerpos.

El método como el presentado en el presente documento también se puede usar para la obtención de anticuerpos o células productoras de anticuerpos, por ejemplo, las que proceden directamente de mezclas de células, en una realización, hibridoma o linfocitos B, o en otra realización, de un hibridoma o linfocito B depositado individualmente, en el que se excluyen los anticuerpos en estado de maduración potencialmente no homogéneo, debido a que es importante identificar anticuerpos completamente maduros con comportamiento de unión entálpico.

El método como el presentado en el presente documento se puede usar en formato de alto rendimiento. En general, los valores de ΔS° se calculan a partir de mediciones que consumen mucho tiempo mediante el uso de un intervalo de temperaturas amplio y la mayor cantidad de puntos de datos como sea posible para obtener una buena correlación lineal destinada a calcular los parámetros del estado de transición de acuerdo con la ecuación de Eyring con $R^2 > 95\%$.

En los métodos como los presentados en el presente documento mediante el uso de solo dos temperaturas, 13 °C y 37 °C, y el modelo cinético reducido "2 frente a 2", se pueden obtener factores de velocidad precisos para la velocidad de asociación. Esto es esencial para las mediciones de ΔS° de alto rendimiento. Al combinar la detección cinética de alto rendimiento para la identificación de anticuerpos que forman complejos con el antígeno altamente estables con la determinación de alto rendimiento de los factores de FV, se pueden seleccionar los mejores anticuerpos.

Por ejemplo, cuando los valores de FV de la Tabla 2 se relacionan con el diagrama de ΔS° /FV, se puede observar que el anticuerpo monoclonal indicado como 1F8 no muestra una entropía de fase de asociación elevada. Esto también se ha confirmado en un formato experimental diferente. El valor medio de FV de las condiciones de los 16 tampones es de 4. El valor de FV de la tabla de referencia 1 es de 4 en condiciones de tampones similares. Dicho ejemplo da evidencia de la aplicabilidad de los análisis de ΔS° de alto rendimiento mediante el uso de los factores de FV como un sustituto de ΔS° .

Tabla 2: Matriz que muestra los factores de velocidad ($FV = k_a(37\text{ °C})/k_a(13\text{ °C})$) de las interacciones entre el anticuerpo 1F8/antígeno para las condiciones de 16 tampones diferentes. Todas las interacciones se midieron en PBS con concentraciones variables de KCl y diferentes valores de pH. Por lo tanto, el anticuerpo 1F8 podría llenar el segmento 1 de la Figura 9.

1F8	pH ↓				
KCl [mM] →		2,7	54	162	324
	6,8	2	4	6	4
	7,0	4	3	4	3
	7,4	4	5	4	4
	7,8	4	4	4	5

El anticuerpo seleccionado con un método como el presentado en el presente documento se puede producir de forma recombinante. Los métodos de producción recombinante de anticuerpos son conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el posterior aislamiento del anticuerpo y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos como los mencionados anteriormente en una célula huésped, se pueden insertar ácidos nucleicos que codifican las respectivas cadenas ligeras y pesadas en vectores de expresión mediante métodos convencionales. La expresión se puede realizar en células huésped procariontas o eucariotas apropiadas como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6(R), levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se puede obtener de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160; Werner, R. G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

La expresión "célula huésped", como se usa en la presente solicitud, indica cualquier tipo de sistema celular que se pueda diseñar para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una realización, se usan células HEK293 y células CHO como células huésped. Como se usan en el presente documento, el término "célula", y las expresiones "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente, y dichas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, el término "transformantes" y la expresión "células transformadas" incluyen la célula objeto principal y los cultivos derivados de la misma, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende

que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie variable que tenga la misma actividad biológica o funcional a la detectada en la célula originalmente transformada.

- 5 La expresión en células NS0 se ha descrita, por ejemplo, por Barnes, L. M., *et al.*, "Cytotechnology" 32 (2000) 109-123; Barnes, L. M., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se ha descrito, por ejemplo, por Durocher, Y., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se ha descrito por Orlandi, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89 (1992) 4285-4289; 5 y Norderhaug, L., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Se ha informado de un sistema de expresión transitoria (HEK 293) por Schlaeger, E. J., y Christensen, K., en "Cytotechnology" 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

La expresión "que se une específicamente" indica la unión de un anticuerpo o fragmento Fab con una constante de disociación ($=k_{Dis}$) de al menos 10^{-8} mol/l o inferior, es decir, de 10^{-9} mol/l, o en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-13} mol/l.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance 10 de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

- 20
- Figura 1 Ilustración de los datos de unión tardía (BL) y estabilidad tardía (SL) para los anticuerpos ilustrativos.
- Figura 2 Representación de la unión tardía/estabilidad del complejo de 549 cultivos primarios de hibridoma: el punto de datos marcado con un círculo muestra una señal de respuesta al antígeno suficiente y una estabilidad del complejo del 100 %, mientras que el punto de datos marcado con un recuadro muestra una respuesta al antígeno insuficiente.
- Figura 3 Respuesta del anticuerpo secundario del sistema de captura de anticuerpos <lgGFCyM>R frente al anticuerpo monoclonal de analito a 25 nM, 50 nM, 75 nM y 100 nM, y a temperaturas crecientes.
- Figura 4 a) Sensograma dependiente de la concentración ilustrativo de la interacción entre anticuerpo-antígeno dependiente de la temperatura del anticuerpo M D1.1. Se midieron las cinéticas en HBS-EP, pH 7,4, a 25 °C, tiempo de asociación de 3 min, tiempo de disociación de 5 min, con ajuste de acuerdo con el modelo Langmuir;
b) Sensograma dependiente de la concentración ilustrativo de la interacción entre anticuerpo-antígeno dependiente de la temperatura del anticuerpo M 9.3.1. Se midieron las cinéticas en HBS-EP, pH 7,4, a 25 °C, tiempo de asociación de 3 min, tiempo de disociación de 15 min, con ajuste de acuerdo con un modelo de Langmuir.
- Figura 5 Cálculo de los parámetros termodinámicos de acuerdo con las ecuaciones lineales de van't Hoff, Eyring y Arrhenius. Representaciones ilustrativas mostradas para el anticuerpo M D1.1.
- Figura 6 a) Representación logarítmica doble de las características dependientes de la temperatura de 34 anticuerpos ilustrativos;
b) Representación logarítmica doble de las características dependientes de la temperatura de tres anticuerpos ilustrativos: círculos rellenos - anticuerpo con afinidad creciente al aumentar la temperatura; círculos vacíos - anticuerpo con afinidad constante al aumentar la temperatura; cuadrados - anticuerpo con afinidad decreciente al aumentar la temperatura.
- Figura 7 Mapa de velocidades con representación logarítmica doble de la constante de disociación del antígeno k_d [1/s] frente a la constante de velocidad de asociación del antígeno k_a [1/ms]; las líneas isométricas indican las zonas de afinidad constante; las cinéticas dependiente de la temperatura de dos anticuerpos humanizados, el anticuerpo 1 (triángulos rellenos) y el anticuerpo 2 (estrellas vacías) se representan en el gradiente de temperaturas de 13 °C a 37 °C en las etapas de +4 °C, partiendo de menores velocidades de asociación a la izquierda del gráfico.
- Figura 8 Datos de la Tabla 1. ΔS^\ddagger se representa frente al FV. Los datos se ajustaron con un modelo de asociación exponencial de acuerdo con la ecuación $y = y_0 + A1 * (1 - \exp(-x/t1)) + A2 * (1 - \exp(-x/t2))$; $Y_0 = -185,05789 \pm 36,83135$; $A1 = 399,74088 \pm 36,60886$; $t1 = 41,93317 \pm 9,834$; $A2 = 198,50729 \pm 29,933$; $t2 = 3,13298 \pm 1,32572$; $R^2 = 0,97575$. La línea discontinua al FV = 10 indica que la mayoría de las interacciones adecuadas muestran un FV < 10.
- Figura 9 Segmentación de la representación de la Figura 8 en cuatro corredores mediante líneas de puntos cortas. Los segmentos están numerados como 1, 2, 3 y 4.

Ejemplo 1

25 Inmunización de ratones

Se sometieron a inmunización intraperitoneal ratones Balb/c de 8-12 semanas con 100 µg de antígeno formulado

como una fusión de KLH (hemocianina de lapa californiana) en coadyuvante de Freud completo.

La inmunización se realizó 4 veces: refuerzo inicial, 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del refuerzo inicial. La segunda y la tercera inmunización se realizaron usando coadyuvante de Freud incompleto. Se realizó i.v. el refuerzo final usando 100 µg de antígeno tres días antes de que tuviera lugar la fusión del hibridoma. La producción de cultivos primarios de hibridoma se realizó de acuerdo con Köhler y Milstein (Kohler, G., *et al.*, *Nature* 256 (1975) 495-497). Se aislaron los hibridomas en placas de microtitulación de 96 pocillos (MTP), por dilución limitada y se exploraron para detectar la unión al antígeno mediante métodos ELISA de acuerdo con el manual del fabricante. Se transfirieron los cultivos de células de hibridoma primarios que mostraron formación de color positiva tras la unión al antígeno en ELISA al proceso de detección cinética.

Ejemplo 2

Preparación de la microplaca de sensor CM5

El sistema BIAcore A100 se preparó bajo el control del software V.1.1 de la siguiente manera: se montó un sensor BIAcore CM5 (serie S) en el sistema y se trató hidrodinámicamente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

En caso del análisis de un anticuerpo murino, se inmovilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal <IgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En caso de usarse anticuerpos quiméricos humanos o completamente humanizados, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal pAb<h-IgG,Fcg-Frag>G-IgG(IS) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En caso de usarse fragmentos Fab o Fab'2 de IgG murina, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal <MFab>G-IgG(IS) (Bethyl L. Cat. n.º A90-100A-5 v. 9.8.200) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En caso de usarse fragmentos Fab o Fab'2 de IgG humana o humanizada, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal <huFab'2>G-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3

Detección cinética de sobrenadantes de cultivo de hibridomas primarios

Se procesaron sobrenadantes de cultivo de hibridomas de diferentes campañas de inmunización realizadas de acuerdo con el Ejemplo 1, como se indica a continuación.

Como referencia, se usaron los puntos 2 y 4 de una microplaca de sensor obtenida de acuerdo con el Ejemplo 2 (1-2, 5-4). Para capturar el anticuerpo sobre la superficie del sensor, se diluyeron a 1:5 sobrenadantes de cultivo de hibridomas con tampón de desplazamiento HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 %, BIAcore) y se inyectaron a 30 µl/min durante 1 min. Seguidamente, se inyectó el antígeno respectivo a 30 µl/min durante un tiempo de asociación de 2 a 3 min. Se controló la fase de disociación durante 5 a 15 min. Finalmente, se regeneró la superficie con una inyección de 2 min de ácido fosfórico 100 mM.

Se preconditionó el sensor mediante ciclos repetidos de captura de anticuerpo y regeneración.

Para la selección de los hibridomas primarios, se usó el siguiente procedimiento: se estableció un punto de referencia de unión tardía (BL) poco antes de que finalizara la inyección del antígeno. Se estableció un punto de referencia de estabilidad tardía (SL) poco antes de la finalización de la fase de disociación del complejo. Se visualizaron gráficamente los datos de BL y SL (Figura 1). Los datos se usaron para calcular la estabilidad del complejo con el antígeno usando la fórmula (XIV):

$$(XIV) \quad (1 - [BL (UR) - SL (UR)] / BL (UR))$$

(véase la Figura 2). Por ejemplo, los puntos de datos marcados con un círculo muestran una señal de respuesta al antígeno suficiente y una estabilidad del complejo del 100 %, mientras que el punto de datos marcado con un recuadro muestra una respuesta al antígeno insuficiente.

Por lo tanto, se han seleccionado los mejores hibridomas al 10 % de acuerdo con la señal de respuesta al antígeno y la estabilidad del complejo.

Ejemplo 4

Clonación de hibridomas y producción de anticuerpos

5 Se subclonaron cultivos primarios de hibridomas productores de anticuerpos, seleccionados de acuerdo con el Ejemplo 3, usando el clasificador de células FACS Aria (Becton Dickinson) bajo el control del software V4.1.2. Se incubaron los clones individuales depositados en condiciones adecuadas para la proliferación adicional en placas de 24 pocillos y se transfirieron posteriormente al proceso de detección termodinámica de acuerdo con el Ejemplo 5, una vez determinada la concentración de anticuerpo en solución usando métodos ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

Ejemplo 5

Detección termodinámica

15

Se caracterizaron anticuerpos secretados mediante detección termodinámica empleando la determinación de la cinética dependiente de la temperatura con el fin de determinar la termoestabilidad del complejo de antígeno-anticuerpo y con el fin de calcular las propiedades termodinámicas.

20 Se montó un sensor CM5 serie S en el sistema BIAcore T100 controlado con el software de control V1.1.1 y se preacondicionó mediante una inyección de 1 min a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ de una mezcla que comprendía SDS al 0,1 %, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H_3PO_4 100 mM.

25 En caso del análisis de un anticuerpo murino, se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal <IgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 En caso de usarse anticuerpos quiméricos humanos o completamente humanizados, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal pAb<h-IgG,Fcg-Frag>G-IgG(IS) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 En caso de usarse fragmentos Fab o Fab'2 de IgG murina, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal <M Fab>G-IgG(IS) (Bethyl L. Cat. n.º A90-100A-5 v. 9.8.200) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 En caso de usarse fragmentos Fab o Fab'2 de IgG humana o humanizada, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal <huFab'2>G-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Se ajustaron los valores de concentración del anticuerpo de referencia para alcanzar niveles de respuesta de anticuerpos secundarios similares a diferentes temperaturas.

Se realizaron medidas cinéticas a diferentes temperaturas a 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, siendo el caudal de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ y 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, respectivamente. Se realizó la inyección de muestra del antígeno durante 30 s, 90 s y 180 s, respectivamente, u otros tiempos de inyección adecuados para lograr la saturación del ligando o la entrada en el equilibrio de unión durante la fase de asociación del complejo (véase la Figura 4 a)). Se monitorizó la velocidad de disociación en primer lugar durante hasta 300 s y después durante 15 min (véase la Figura 4 b)). Se repitieron las inyecciones de antígeno en diferentes etapas de concentración de al menos cinco concentraciones. Como control, se analizó una etapa de concentración dos veces para controlar la reproducibilidad del ensayo. La célula de flujo 1 sirvió como referencia. Se usó una inyección de tampón en lugar de una inyección de antígeno para una referencia doble de los datos por sustracción de la señal de tampón. Se regeneró el sistema de captura usando H_3PO_4 100 mM mediante una inyección de 2 min a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se optimizó el procedimiento de regeneración para garantizar la regeneración de la superficie cuantitativa también a 13 °C, 17 °C y 21 °C. A estas temperaturas, se inyectó tres veces la solución de regeneración mientras que a 25 °C, 29 °C, 33 °C y 37 °C, la solución de regeneración se inyectó una vez.

55

Se evaluaron los datos obtenidos de acuerdo con un modelo de interacción de Langmuir binario 1:1 para calcular la constante de velocidad de asociación k_a [1/MS], la constante de velocidad de disociación k_d [1/s] y la constante de afinidad resultante K_D [M] a diferentes temperaturas. Se calcularon los datos del equilibrio termodinámico de acuerdo con la forma lineal de la ecuación de Van't Hoff. Se calculó la termodinámica en el estado de transición de acuerdo con las ecuaciones de Eyring y Arrhenius usando, por ejemplo, el software de evaluación BIAcore T100 V.1.1.1 o el programa Origin 7SRT v. 7.0300.

60

Ejemplo 6

65

Ejemplo del efecto de ajustar valores de $UR_{\text{MÁX}}$ homogéneos

El dispositivo BIAcore T100 se montó con un sensor BIAcore CM5 series-S, y se inmovilizó con 6000 UR de <IgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., EE. UU.) en cada célula de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El experimento no optimizado usó anticuerpo de captura 40 nM a 20 µl/min, en tampón de HBS-EP (P20 al 0,05 %). El tampón de muestra fue el tampón del sistema, suplementado con 1 mg/ml de CMD (carboximetildextrano).

Se inyectó el antígeno tras la captura del anticuerpo secundario en 6 etapas de concentración de 1,2 nM, 4 nM, 11 nM, 33 nM, 100 nM y 300 nM, mediante lo que se usó 11 nM como control doble y se usó 0 nM como referencia. Se inyectó el antígeno a 100 µl/min durante una asociación de 2 min y una disociación de 5 min, seguido de un lavado con HBS-EP de 15 min a 30 µl/min y una regeneración con glicina 10 mM, pH 1,7, a 3 µl/min durante 3 min. Se realizaron medidas dependientes de la concentración a 4 °C, 11 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C y 40 °C.

Se usó el sistema optimizado como se describe anteriormente, pero con las excepciones de que se inyectó el anticuerpo que se iba a capturar durante un tiempo de asociación de 3 min a etapas de concentración diferentes de 100 nM a 15 °C, 80 nM a 20 °C, 60 nM a 25 °C, 50 nM a 30 °C, 40 nM a 35 °C y 40 nM a 40 °C.

Finalmente, se determinaron la cinética y la termodinámica usando el software de evaluación BIAcore.

Ejemplo 7

Determinación y cálculo del factor de velocidad

Se montó un sensor CM5 serie S en el sistema BIAcore T100.

En caso de usarse anticuerpos murinos, se inmovilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal <IgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En caso de usarse anticuerpos quiméricos humanos o completamente humanizados, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal pAb<h-IgG,Fcg-Frag>G-IgG(IS) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En caso de usarse fragmentos Fab o Fab'2 de IgG murina, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal <M Fab> G-IgG(IS) (Bethyl L. Cat. n.º A90-100A-5 v. 9.8.200) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En caso de usarse fragmentos Fab o Fab'2 de IgG humana o humanizada, se inmovilizó el anticuerpo de cabra policlonal <huFab'2>G-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) en todas las celdas de flujo por medio de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El tampón de muestra fue el tampón del sistema suplementado con carboximetildextrano a 1 mg/ml para reducir los efectos inespecíficos de la matriz del sensor. Se realizaron mediciones cinéticas en el gradiente de temperatura de 13 °C a 37 °C a 100 µl/min.

Se realizaron las inyecciones de analito de antígeno de longitud completa humano sintético recombinante 1, antígeno humano recombinante 2 (10 kDa), quimera de FC humana de antígeno humano recombinante 3 (R & D Systems, 160 kDa), antígeno humano recombinante 4 (29 kDa) o antígeno humano recombinante 5 (72 kDa) durante 180 segundos. Se monitorizó la velocidad de disociación durante un máximo de 900 segundos. Las inyecciones de antígeno se repitieron en diferentes etapas de concentración de al menos cinco concentraciones. Como control, se analizó una etapa de concentración dos veces para controlar la reproducibilidad del ensayo. Se usó la celda de flujo 1 como referencia. Se usó una inyección de tampón en blanco en lugar de una inyección de antígeno para duplicar la referencia a los datos mediante la sustracción de la señal del tampón.

Antes de cada ensayo, se ajustaron los valores de UR_{MÁX} homogéneos en el intervalo de temperatura de 13 °C a 37 °C mediante experimentos de titulación con los respectivos anticuerpos para su presentación en la superficie del sensor (véase el apartado en el que se describen detalladamente los experimentos de titulación dependientes de la temperatura). Se midieron las cinéticas en el gradiente de temperatura de 13 °C, 17 °C, 21 °C, 25 °C, 29 °C, 33 °C y 37 °C. Los sistemas de captura se regeneraron usando un lavado con el tampón de HBS-ET a 30 µl/min durante 15 s, antes de la regeneración con glicina 10 mM, pH 1,5 a 30 µl/min durante 15 s, seguida de una inyección de 1 min y una inyección de 30 segundos de glicina 10 mM a pH 1,7.

Los datos obtenidos se evaluaron de acuerdo con un modelo de interacción de Langmuir binario 1:1 para calcular las constantes de velocidad de asociación k_a [1/Ms], las constantes de velocidad de disociación k_d [1/s] y las constantes de afinidad resultantes K_D [M] a las respectivas temperaturas. Los datos de equilibrio termodinámico se calcularon de acuerdo con la forma lineal y no lineal de la ecuación de van't Hoff. La termodinámica del estado de transición se calculó de acuerdo con las ecuaciones de Eyring y Arrhenius, usando, por ejemplo, el software de evaluación

BIAcore T100 V.1.1.1. La evaluación gráfica se realizó usando Origin 7SRI v. 7.0300.

El factor de velocidad (FV) se calculó como el cociente de las velocidades de asociación k_a (1/Ms) del complejo de antígeno a 37 °C y 13 °C. Se usó la curva de ajuste de la asociación exponencial $y = y_0 + A1*(1-\exp(-x/t1)) + A2*(1-\exp(-x/t2))$.

Ejemplo 8

Análisis del factor de velocidad de alto rendimiento

Se montó un sensor CM5 serie S en el sistema BIAcore T100 y se trataron los puntos de detección hidrodinámicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se inmovilizó el anticuerpo IgG de conejo policlonal <IgGFCyM> R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a 4 kUR en los puntos de detección 1 y 5 de cada celda de flujo. Se inmovilizaron 800 UR de <IgGFCyM>R en los puntos 2 y 4 de cada celda de flujo. El acoplamiento se realizó a través de la química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de muestra fue el tampón del sistema suplementado con carboximetildextrano a 1 mg/ml para reducir los efectos inespecíficos de la matriz del sensor.

El sistema de tampón básico fue PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se ajustó el tampón a cuatro condiciones diferentes de pH: pH 6,8, pH 7,0, pH 7,4 y pH 7,8, y cuatro concentraciones de KCl diferentes: 2,7 mM, 54 mM, 162 mM y 324 mM. Se ensayaron dieciséis condiciones de tampón de muestra diferentes.

Se inyectaron los anticuerpos monoclonales que se iban a capturar a 10 µl/min durante 1 min en diferentes etapas de concentración entre 60 nM a 37 °C y 240 nM a 13 °C para garantizar los valores de UR_{MAX} homogéneos en las mediciones posteriores de interacción con el antígeno.

Se realizaron las mediciones cinéticas en el gradiente de temperatura de 13 °C a 37 °C a 30 µl/min. Se realizaron las inyecciones de analito de antígeno humano recombinante 1-84 (9,4 kDa) durante 180 segundos. Se monitorizó la velocidad de disociación durante 600 segundos. Se repitieron las inyecciones de antígeno en dos etapas de concentración a 60 nM y 240 nM. Se usó una inyección de tampón en blanco en lugar de una inyección de antígeno para duplicar la referencia a los datos mediante la sustracción de la señal del tampón.

Se regeneró el sistema de captura usando un lavado durante 15 segundos con tampón de HBS-ET a 30 µl/min, antes de la regeneración con glicina 10 mM, pH 1,5, a 30 µl/min durante 90 segundos, seguido de 2 inyecciones de 30 segundos del mismo tampón.

Se evaluaron los datos cinéticos de acuerdo con un modelo cinético de "2 frente a 2", que usa dos densidades de ligando diferentes de la matriz del sensor para calcular la cinética solo mediante el uso de dos concentraciones de antígeno. Las constantes de velocidad de asociación k_a [1/Ms], las constantes de velocidad de disociación k_d [1/s] y las constantes de afinidad resultante KD [M] a las respectivas temperaturas se calcularon usando el software de evaluación BIAcore A100 1.1.

Los datos de equilibrio termodinámico se calcularon a partir de los datos cinéticos de acuerdo con la forma lineal de la ecuación de Van't Hoff. Se calculó la termodinámica del estado de transición de acuerdo con las ecuaciones Eyring usando Excel. Se realizó la evaluación gráfica usando Origin 7SRI v. 7.0300. El factor de velocidad (FV) para la fase de asociación se calculó como el cociente de las velocidades de asociación de los complejos de antígeno k_a (1/Ms) a 37 °C y 13 °C. El factor de velocidad para las velocidades de disociación se calculó como el cociente de k_d (1/s) a 13 °C y 37 °C.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) proporcionar una multitud de anticuerpos;
b) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 37 °C y la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo con su antígeno a 13 °C;
c) calcular la relación entre la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C;
10 d) seleccionar un anticuerpo con una relación de 10 o inferior, obteniéndose así un anticuerpo.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la determinación es con resonancia de plasmón superficial.
- 15 3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la selección es mediante el cálculo de la relación y mediante la determinación de ΔS^\ddagger as.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado por que, en la resonancia de plasmón superficial, el antígeno se inmoviliza en la microplaca de resonancia de plasmón superficial.
- 20 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que se selecciona un anticuerpo con ΔS^\ddagger as inferior a 200 J/mol*K.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que cada uno de los anticuerpos es producido por un solo hibridoma o linfocito B.
- 25 7. Método de producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una multitud de células productoras de anticuerpos;
30 b) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo producido por cada célula productora de anticuerpo con un antígeno a 37 °C y a 13 °C;
c) calcular la relación entre la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C;
d) seleccionar una célula productora de anticuerpo que produzca un anticuerpo con una relación de 10 o inferior;
35 e) cultivar la célula seleccionada;
f) recuperar el anticuerpo de la célula seleccionada cultivada o del medio de cultivo de la misma, produciendo de ese modo un anticuerpo.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que las células productoras de anticuerpos de la etapa a) se depositan como células individuales.
- 40 9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que comprende la etapa adicional de cultivar las células individuales depositadas antes de la selección.
- 45 10. Método de obtención de un anticuerpo humanizado que comprende:
- a) proporcionar un anticuerpo parental;
b) proporcionar un conjunto de formas humanizadas del anticuerpo parental;
c) determinar la constante de velocidad de asociación de cada anticuerpo humanizado con su antígeno a 37 °C y a 50 13 °C;
d) calcular la relación entre la constante de velocidad de asociación a 37 °C y la constante de velocidad de asociación a 13 °C;
e) comparar la relación de las formas humanizadas con la relación del anticuerpo parental;
f) seleccionar una forma humanizada como anticuerpo humanizado con una relación que es inferior al doble de la 55 relación del anticuerpo parental, obteniéndose así un anticuerpo humanizado.

Fig. 1

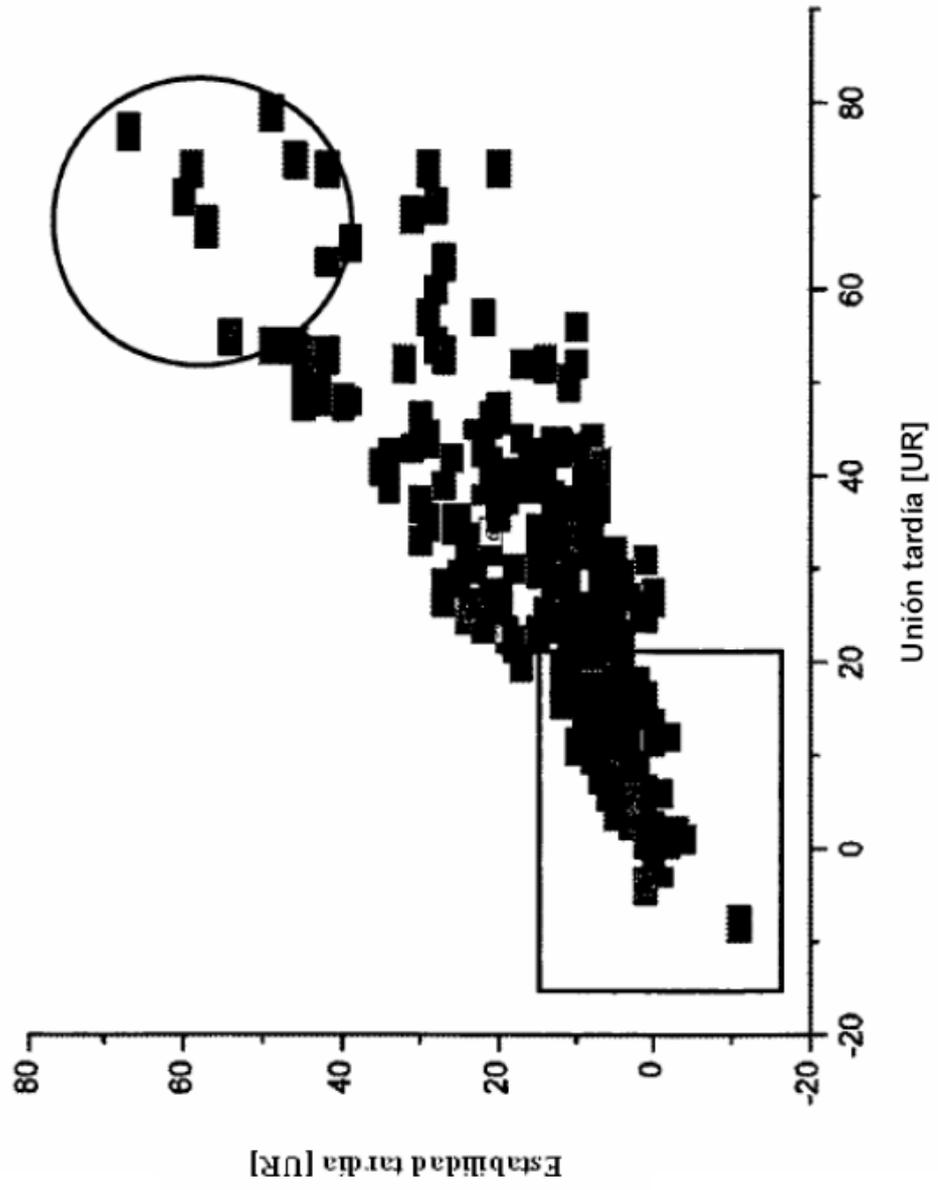


Fig. 2

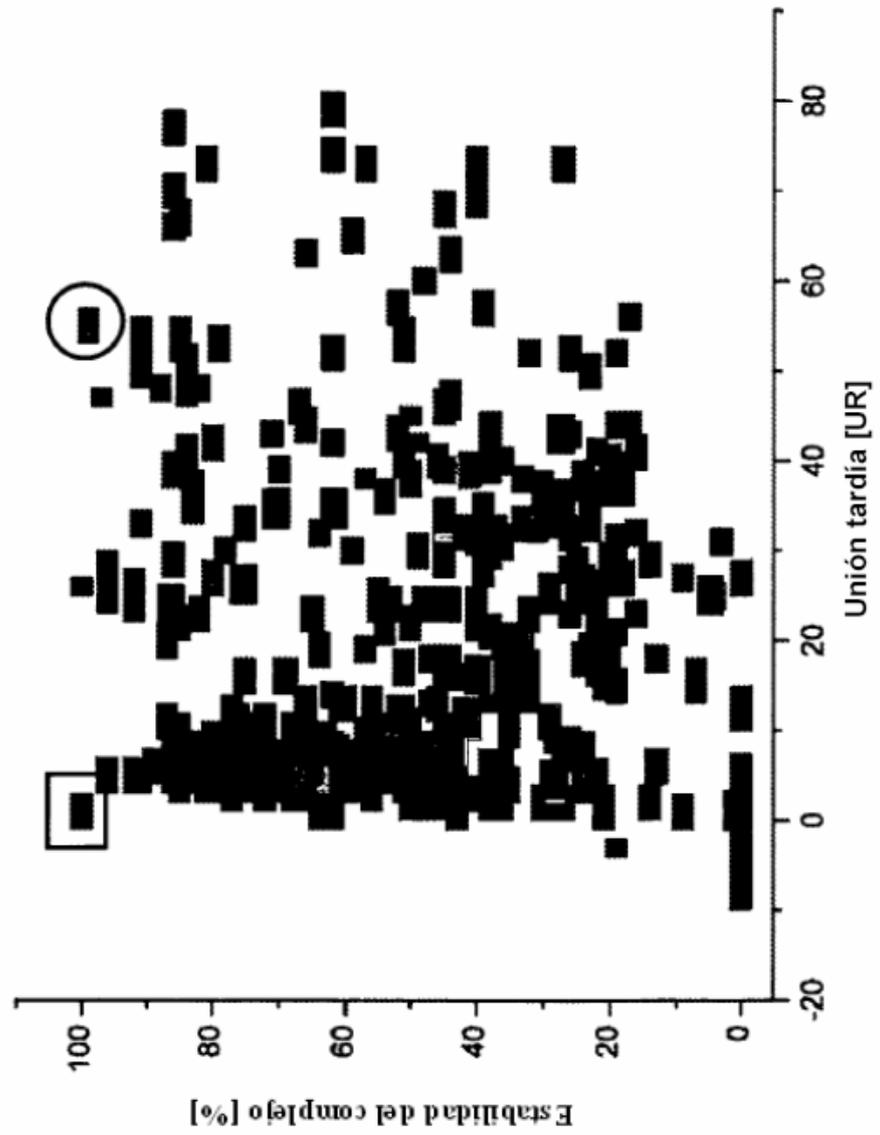


Fig. 3

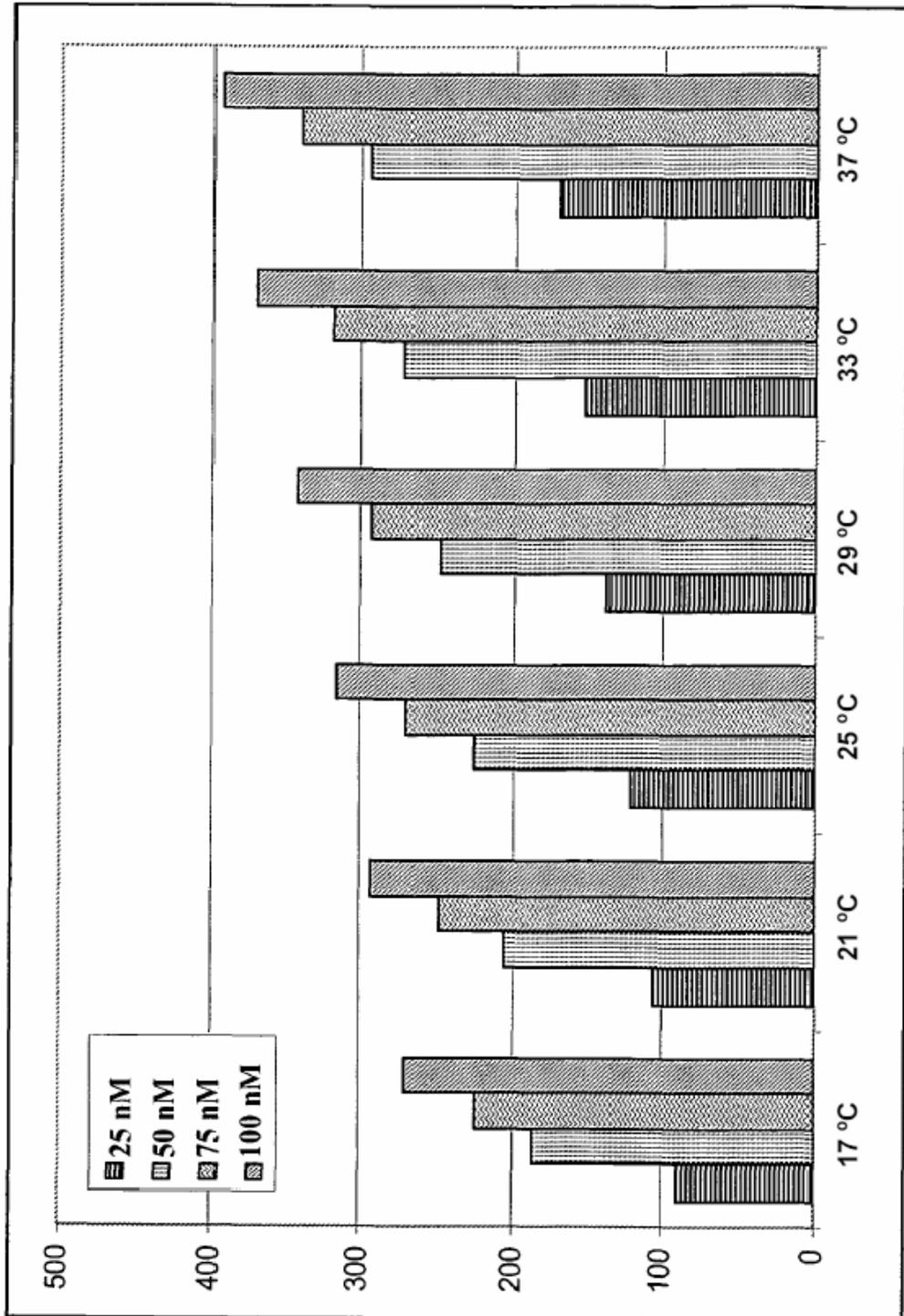


Fig. 4a

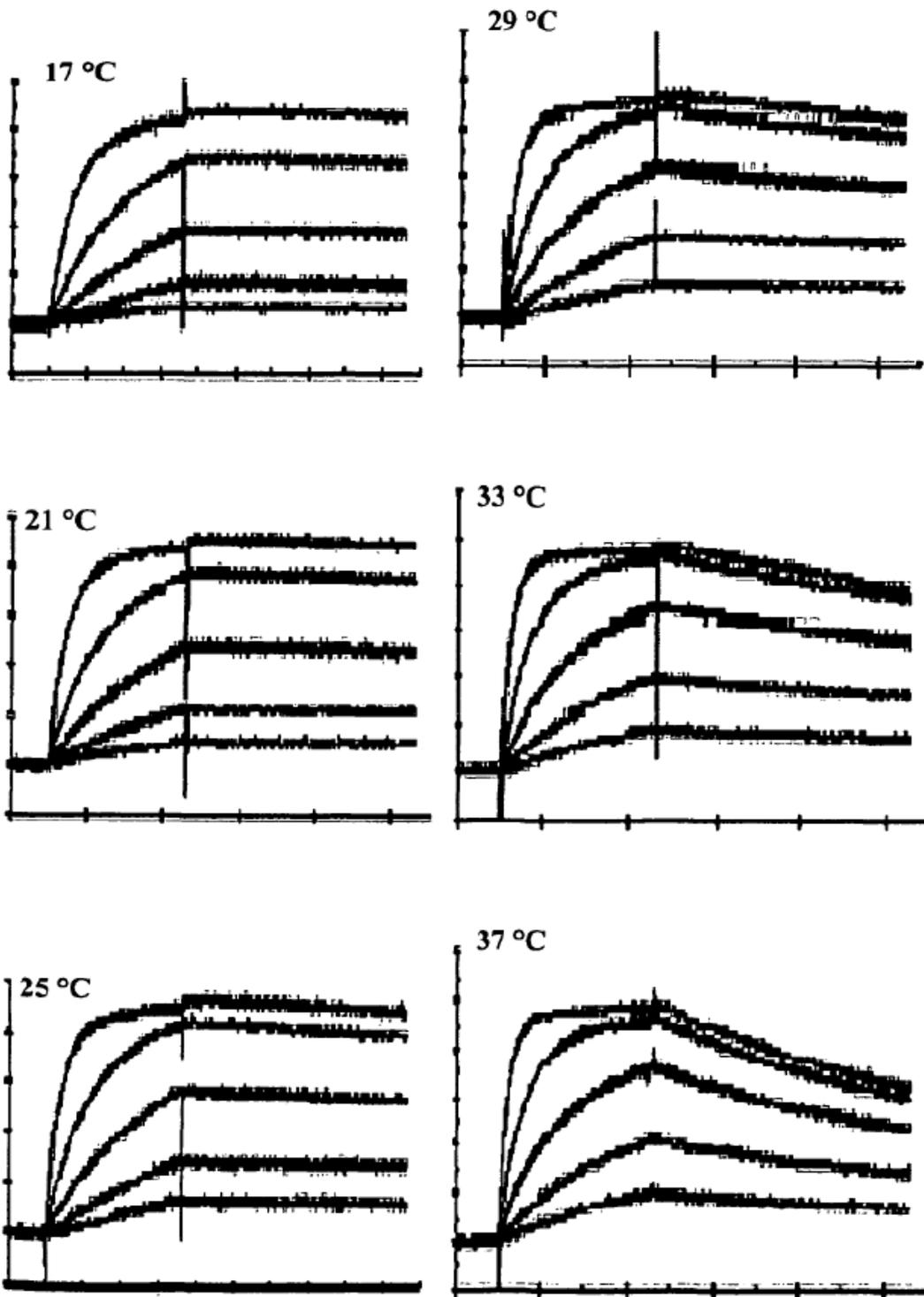
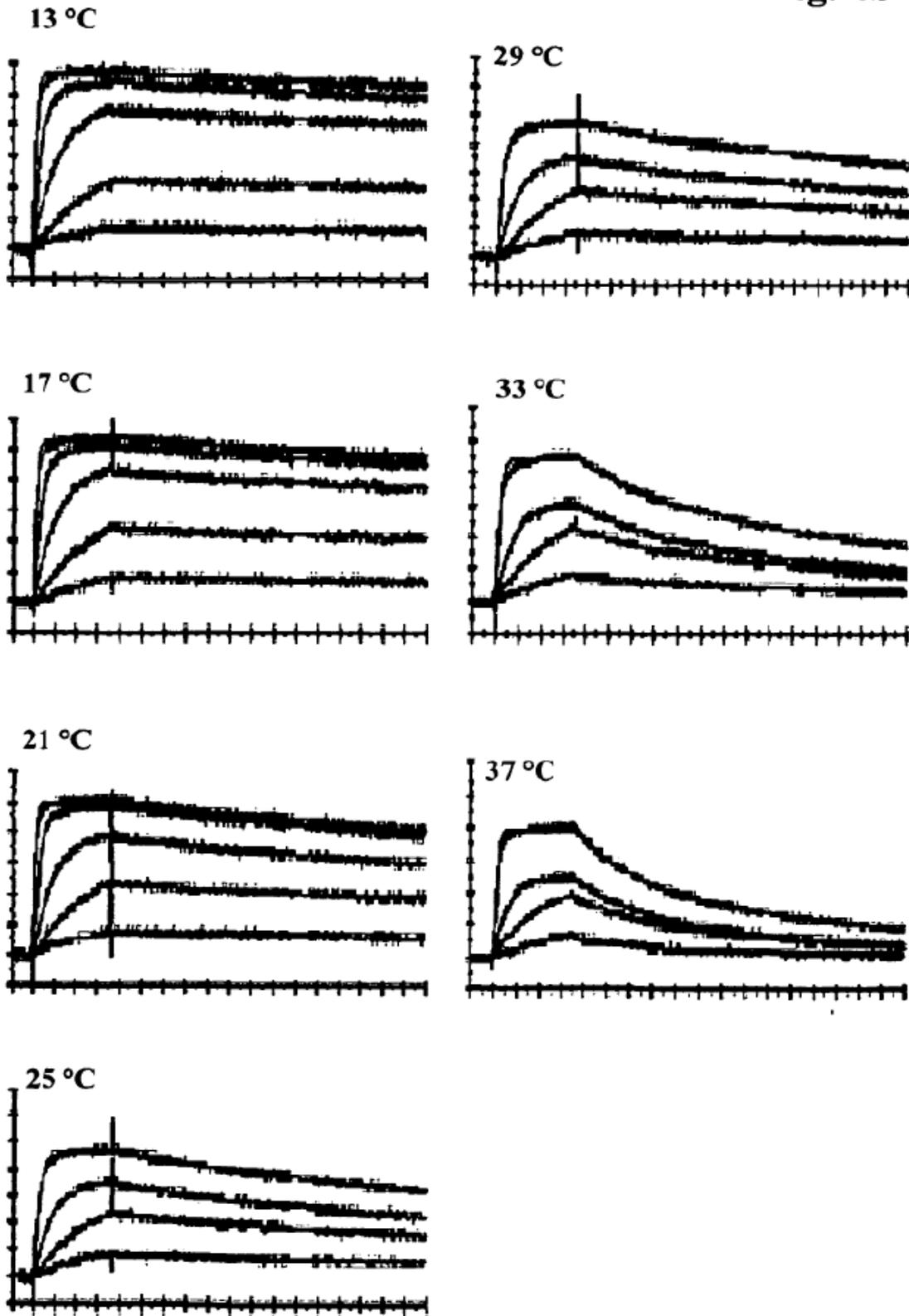


Fig. 4b



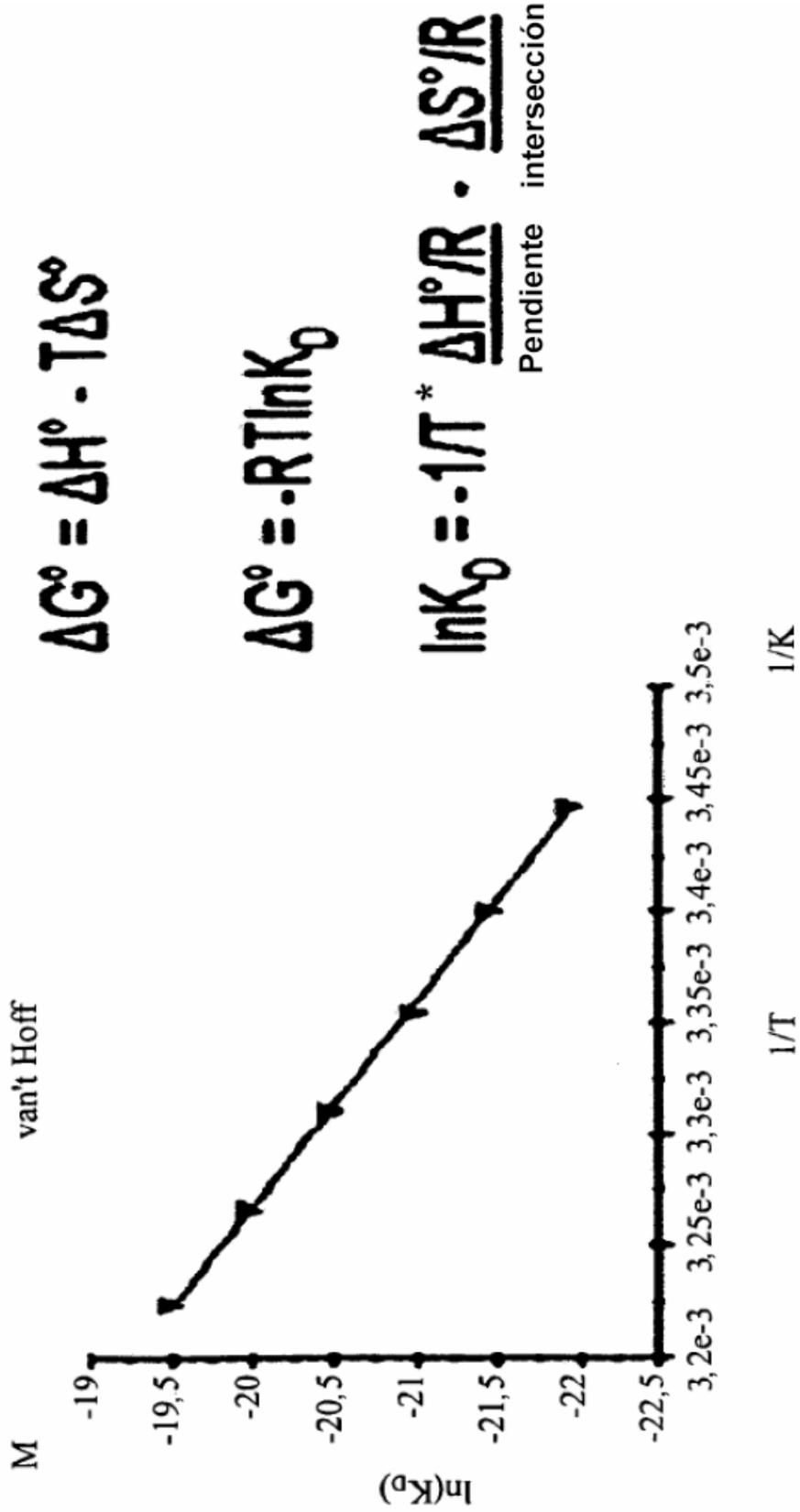


Fig. 5a

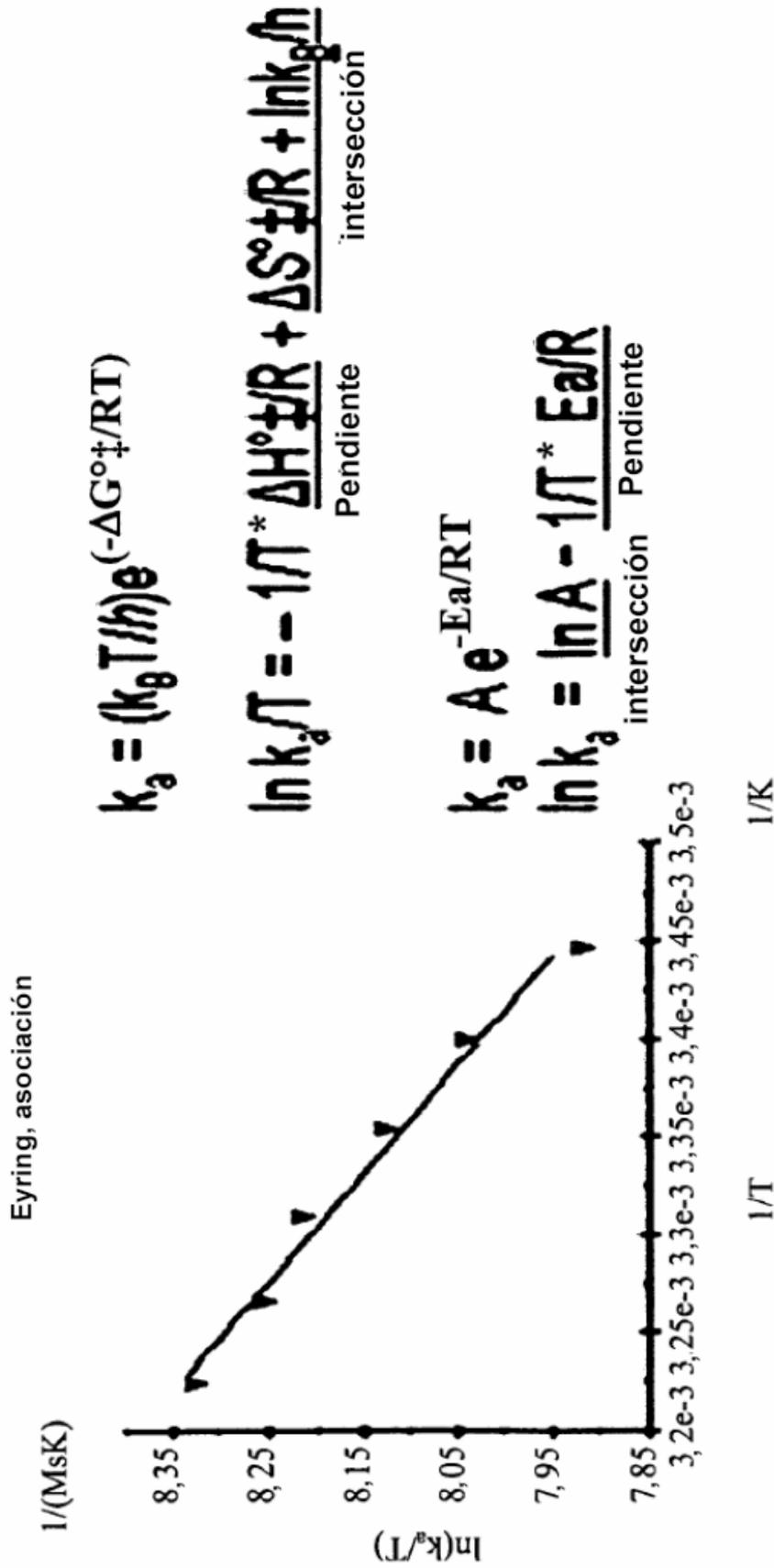


Fig. 5b

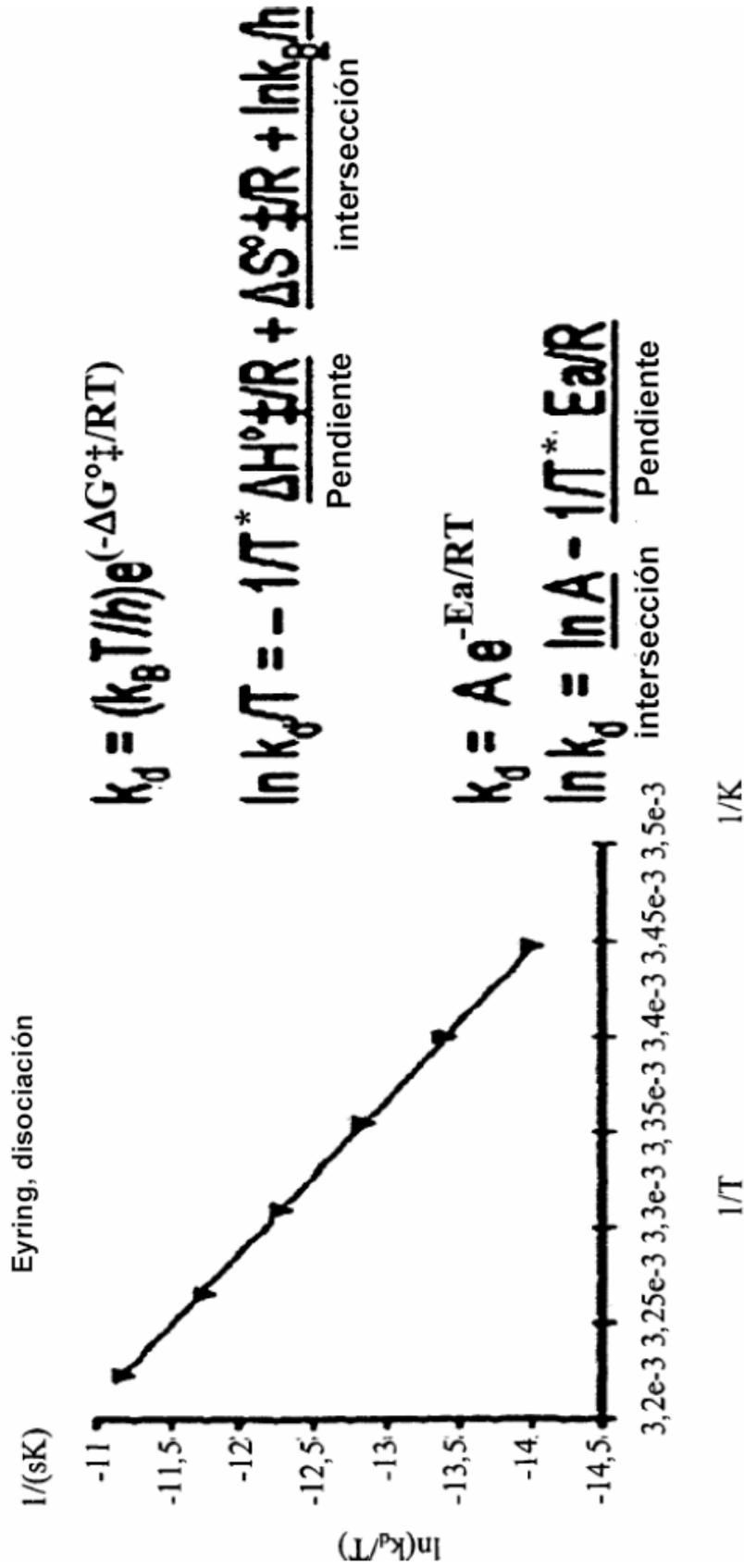


Fig. 5c

Fig. 6a

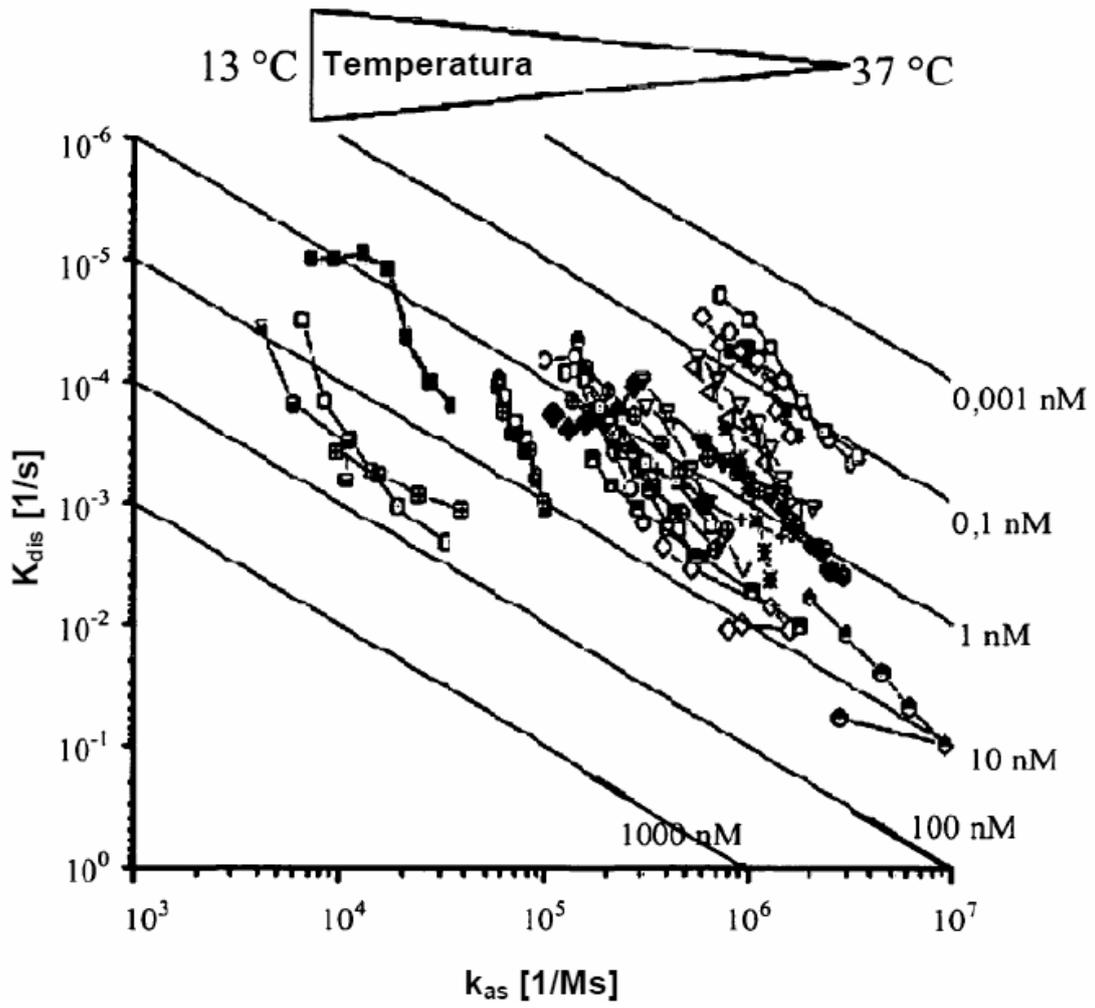


Fig. 6b

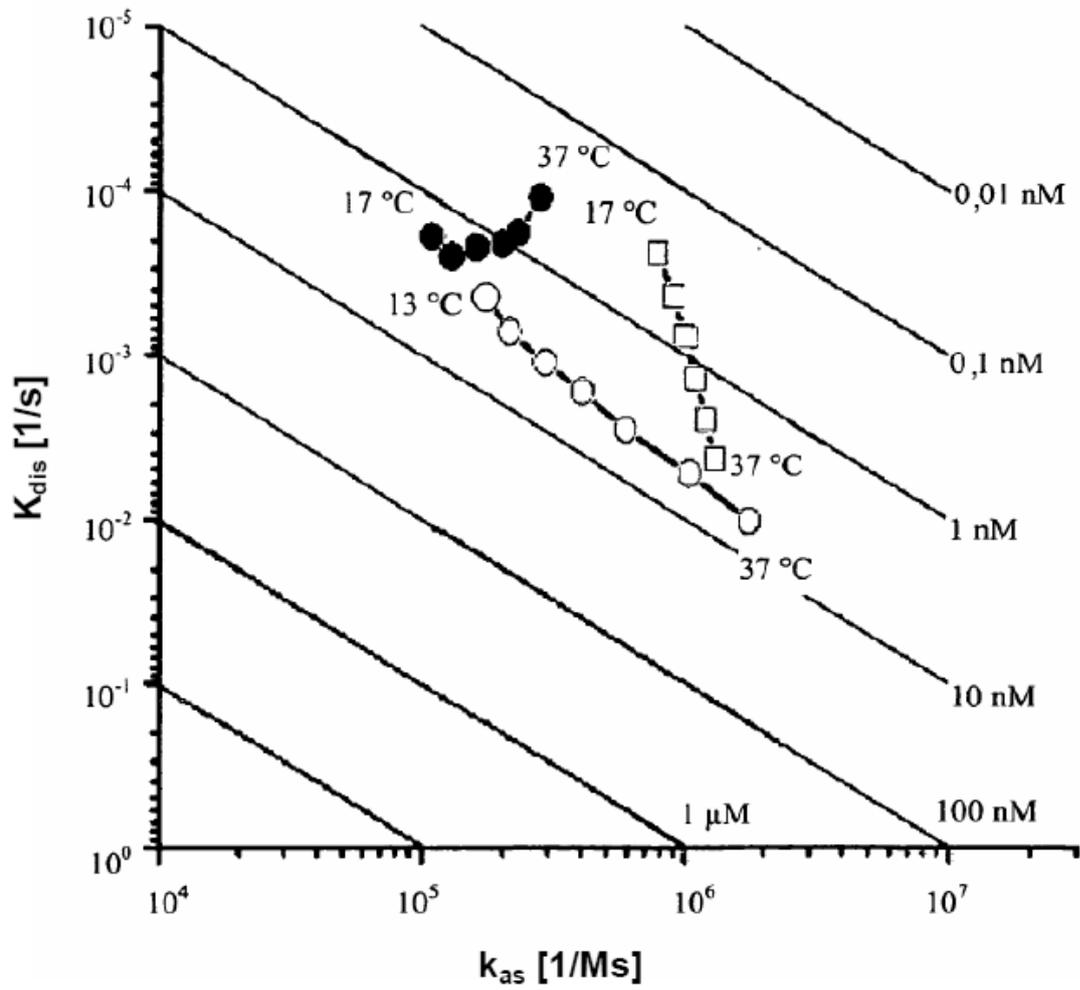


Fig. 7

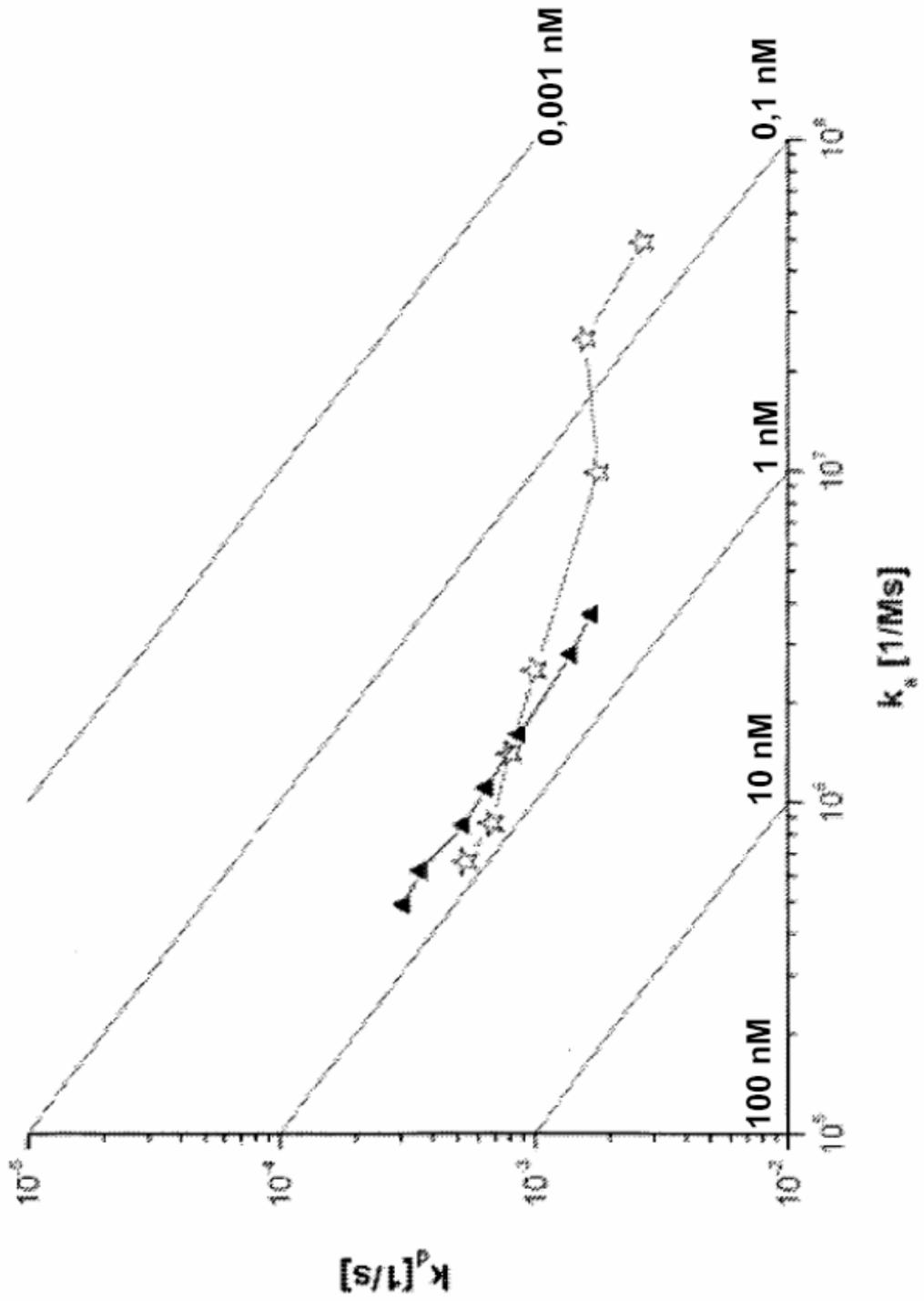


Fig. 8

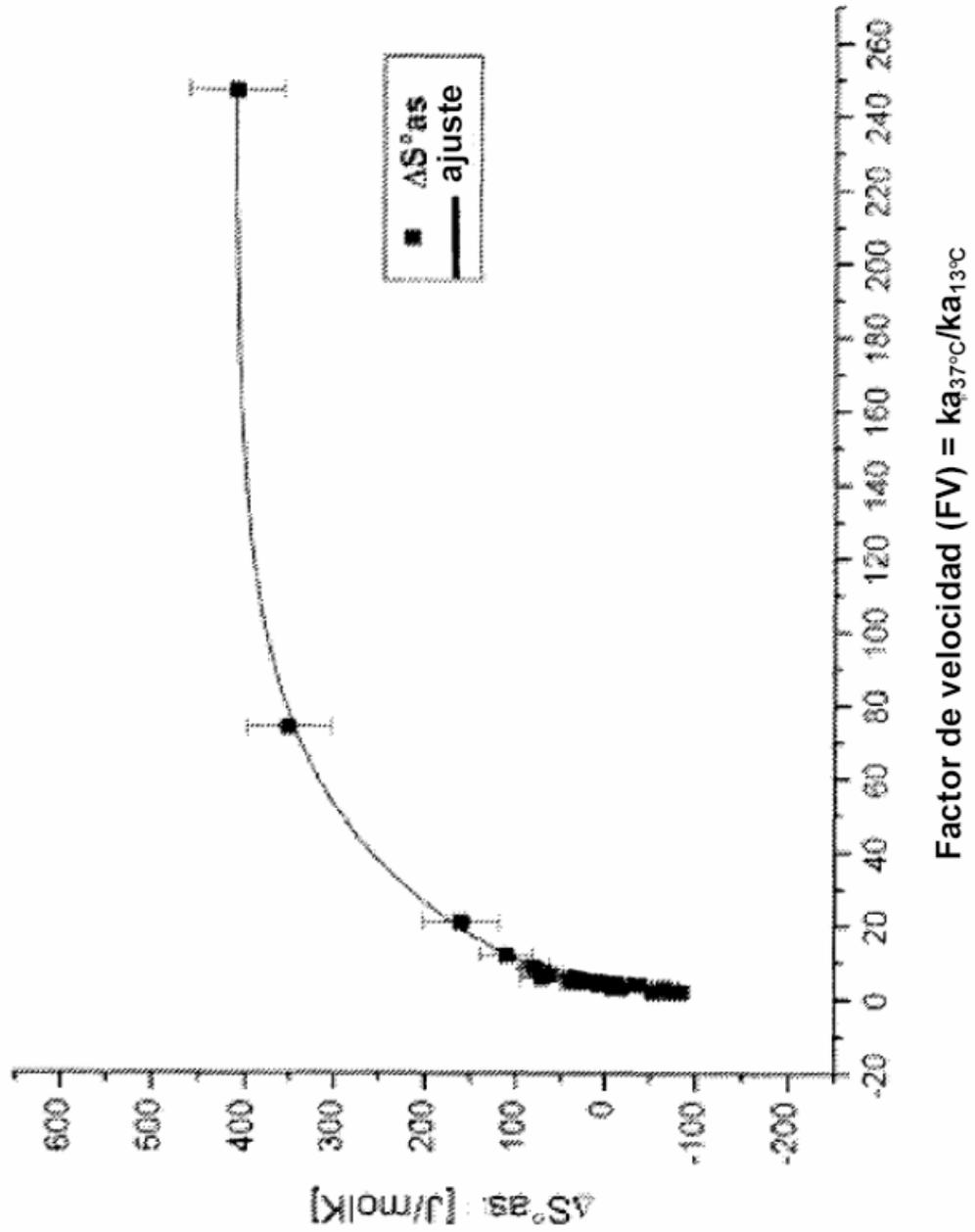


Fig. 9

