

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 482**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/EP2013/064683**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009474**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13735290 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2872893**

54 Título: **Procedimiento para la detección de una proteína de unión multiespecífica**

30 Prioridad:

13.07.2012 EP 12176342

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

28.07.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR y

ZADAK, MARKUS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 627 482 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

Procedimiento para la detección de una proteína de unión multiespecífica

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de una proteína de unión multiespecífica en una muestra, en el que se detecta la proteína de unión multiespecífica usando anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra los diferentes determinantes antigénicos de la proteína de unión multiespecífica.

Antecedentes de la invención

10 Los inmunoensayos en fase sólida estándar con anticuerpos implican la formación de un complejo entre un anticuerpo adsorbido/inmovilizado en una fase sólida (anticuerpo de captura), el antígeno, y un anticuerpo contra otro epítipo del antígeno conjugado con una enzima o marcador detectable (anticuerpo de detección). En el ensayo, se forma un sándwich: fase sólida/anticuerpo de captura/antígeno/anticuerpo de detección. En la reacción catalizada por el sándwich, entre otras cosas, la actividad de la enzima conjugada con el anticuerpo es proporcional a la
15 concentración de antígeno en el medio de incubación. Los ensayos de anticuerpos anti-idiotipo se mencionan, por ejemplo, en el documento US 5.219.730; el documento WO 87/002778; el documento EP 0 139 389; y el documento EP 0 170 302. Wadhwa, M., *et al.* (J. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17) informan de estrategias para la detección, medición y caracterización de anticuerpos indeseados inducidos por fármacos biológicos. En el documento EP 1 917
20 854 se informa de un procedimiento para producir anticuerpos anti-idiotipo.

En el documento WO 2008/119353 se informa de anticuerpos biespecíficos y procedimientos para producir los mismos. Se informa de un procedimiento *ex vivo* para la generación de un anticuerpo biespecífico, que comprende las etapas de: a) proporcionar un primer anticuerpo que tenga un primer determinante antigénico, en el que dicho primer anticuerpo comprende una región CH3 similar a IgG4, b) proporcionar un segundo anticuerpo que tenga un segundo determinante antigénico que difiera de dicho primer determinante antigénico, en el que dicho segundo anticuerpo comprende una región CH3 similar a IgG4, c) incubar juntos dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones reductoras que permitan que las cisteínas en la región bisagra del núcleo consigan una isomerización de los enlaces disulfuro y d) obtener un anticuerpo biespecífico. En el documento WO 2006/096697, se informa de procedimientos para determinar la bivalencia de fármacos de anticuerpos y proteínas. En el documento WO
25 2008/134046 se informa de anticuerpos anti-CD4 potentes, estables y no inmunodepresores. Muller, K.M., *et al.* informan de que se puede usar el primer dominio constante (CH1 y CL) de un anticuerpo como dominio de heterodimerización para minianticuerpos biespecíficos.

Sumario de la invención

Se ha descubierto que usando dos anticuerpos anti-idiotipo como anticuerpo de captura y de detección en un inmunoensayo de tipo sándwich para la determinación de la cantidad de un anticuerpo multiespecífico en una muestra, de forma que cada uno de los anticuerpos anti-idiotipo se une a determinantes antigénicos diferentes del anticuerpo multiespecífico, se pueden minimizar las influencias debidas a la matriz de la muestra (por ejemplo, plasma humano o suero, antígenos, etc.). Adicionalmente, es posible usar una configuración de ensayo que sea más sensible, menos influenciada por la matriz de la muestra, se pueda realizar más rápidamente, requiera una eliminación/dilución mínima de la matriz de la muestra y proporcione más flexibilidad para el marcado/derivatización/inmovilización del anticuerpo de captura y/o de detección, respectivamente. Esto se logra usando dos anticuerpos anti-idiotipo, uno dirigido contra el primer determinante antigénico del anticuerpo biespecífico y otro contra el segundo determinante antigénico del anticuerpo biespecífico.

De esta manera, en el presente documento se informa de un procedimiento para la determinación (inmunológica) de la cantidad de una proteína de unión multiespecífica en una muestra que comprende la etapa de:

50 - determinar la cantidad de un complejo formado entre

i) un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica, y

55 ii) la proteína de unión multiespecífica

incubar el complejo con un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica, que es diferente del primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico, y

60 determinar así la cantidad de la proteína de unión multiespecífica en la muestra.

Un aspecto que se informa en el presente documento es un procedimiento para la determinación de la cantidad total de un anticuerpo multiespecífico terapéutico en una muestra de suero o plasma en un inmunoensayo de tipo sándwich que comprende la etapa de:

65

- 5 - determinar la cantidad de un complejo formado entre i) un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, y ii) el anticuerpo multiespecífico terapéutico incubando el complejo con un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, que es diferente del primer determinante antigénico y determinar así la cantidad del anticuerpo multiespecífico terapéutico en la muestra,
- en el que se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico con una fase sólida,
- 10 en el que se marca el anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, y
- en el que se correlaciona directamente la cantidad del anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico unido con la cantidad de anticuerpo multiespecífico terapéutico en la muestra.
- 15 En un modo de realización, la muestra es suero humano o plasma humano. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, o un anticuerpo triespecífico, o un anticuerpo tetraespecífico, o un anticuerpo pentaespecífico o un anticuerpo hexaespecífico. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
- 20 En un modo de realización, el determinante antigénico es un sitio de unión o una pareja de un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo.
- 25 En un modo de realización, el anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica está biotinilado y la fase sólida está recubierta de estreptavidina. En un modo de realización, la fase sólida es una microesfera paramagnética recubierta con estreptavidina o una microesfera de sefarosa recubierta con estreptavidina.
- 30 En un modo de realización, el anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente al segundo determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica está digoxigenilado.
- En un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de
- 35 - determinar la cantidad de un complejo formado entre
- i) un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica,
- 40 ii) la proteína de unión multiespecífica, y
- iii) un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica y que comprende un marcador detectable,
- 45 mediante la determinación del marcador detectable en el complejo formado.
- En un modo de realización, se realiza la conjugación de un anticuerpo anti-idiotipo con su ligando uniendo químicamente por medio de grupos N-terminales y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólico de la cadena principal aminoacídica del anticuerpo terapéutico y/o grupos alditol de la estructura glucídica del anticuerpo terapéutico.
- 50 En un modo de realización, el anticuerpo anti-idiotipo es una mezcla que comprende el anticuerpo anti-idiotipo conjugado por medio de al menos dos grupos amino diferentes con la fase sólida. Se puede realizar dicho acoplamiento por medio de grupos amino diferentes mediante acilación de una parte de los grupos ϵ -amino con agentes protectores químicos, por ejemplo, mediante citraconilación, en una primera etapa. En una segunda etapa, se realiza la conjugación por medio de los grupos amino restantes. Posteriormente, se elimina la citraconilación y se conjuga el anticuerpo con la fase sólida por medio de los grupos amino libres restantes, es decir, se conjuga el anticuerpo obtenido con la fase sólida por medio de grupos amino que no se han protegido por citraconilación. Los agentes protectores químicos adecuados forman enlaces en aminas de cadena lateral no protegida y son menos estables y diferentes de los enlaces en el extremo N. Se conocen muchos de dichos agentes protectores químicos (véase, por ejemplo, el documento EP 0 651 761). En un modo de realización, los agentes protectores químicos incluyen anhídridos de ácidos dicarboxílicos cíclicos, como anhídrido de ácido maleico o citracónico.
- 55 En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo con la fase sólida mediante adsorción pasiva. Por ejemplo, se describe la adsorción pasiva en Butler, J.E., in "Solid Phases in Immunoassay" (1996) 205-225 y Diamandis, E.P., and Christopoulos, T.K. (editores), en "Immunoassays" (1996) Academic Press (San Diego).
- 65

En un modo de realización, se conjuga (inmoviliza) el anticuerpo anti-idiotipo por medio de una pareja de unión específica. En un modo de realización, dicha pareja de unión (primer componente/segundo componente) se selecciona de estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., *et al.*, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996) lectina/polisacárido, esteroide/proteína de unión a esteroides, hormona/receptor de hormonas, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G, etc. En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo con biotina y se realiza la inmovilización por medio de estreptavidina o avidina inmovilizada.

Descripción de las figuras

Figura 1 Principio del ensayo ELISA farmacocinético esquemático para la determinación de concentraciones de anticuerpos biespecíficos en muestras celulares y de suero (ELISA basado en anticuerpos anti-idiotipo).

Figura 2 ELISA de tipo sándwich basado en antígenos para la detección de anticuerpos anti-VEGF/ANG2. Se recubrió directamente angiopoyetina 2 humana recombinante en una placa de microtitulación. En paralelo, se preincubaron muestras que contenían anticuerpos anti-VEGF/ANG2 con VEGF recombinante marcado con digoxigenina. Después del recubrimiento, la placa se lavó e incubó con la mezcla preincubada. Los complejos de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 y VEGF marcado con digoxigenina se unen a la ANG2 en la superficie de la placa de microtitulación. Se detectó el VEGF marcado con digoxigenina unido con el conjugado anticuerpo anti-digoxigenina-HRP y ABTS.

Figura 3 Comparación de las curvas de calibración obtenidas en un ELISA basado en antígenos (A) y un ELISA basado en anticuerpos anti-idiotipo (B) para la detección de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 biespecífico.

Figura 4 Comparación de las curvas de calibración del ELISA basado en anticuerpos anti-idiotipo y del ELISA basado en antígenos en presencia de suero humano al 5 %, 10 % y 20 %.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se informa de un procedimiento *in vitro* para la determinación de la cantidad de una proteína de unión multiespecífica, tal como fármacos/anticuerpos biespecíficos, en muestras preclínicas y clínicas. Se ha descubierto que se tiene que detectar una proteína de unión multiespecífica en una muestra usando dos anticuerpos anti-idiotipo que se unen a diferentes determinantes antigénicos de la proteína de unión multiespecífica a fin de minimizar las influencias por la matriz de la muestra y permitir un mayor grado de flexibilidad en la configuración y realización de la determinación inmunológica de la cantidad de la proteína de unión multiespecífica en la muestra.

A continuación, se ejemplifica el procedimiento que se informa en el presente documento con un anticuerpo multiespecífico como aspecto de una proteína de unión multiespecífica.

Se usa el término "anticuerpo" en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

La proteína de unión multiespecífica es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen determinantes antigénicos para al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, uno de los determinantes antigénicos es para un primer antígeno y la otra para un segundo antígeno diferente. En determinados modos de realización, se pueden unir anticuerpos biespecíficos a dos epítopos diferentes del mismo antígeno. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un primer y un segundo antígeno. En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico tiene i) un primer determinante antigénico que se une específicamente a un primer antígeno o un primer epítipo en un antígeno y ii) un segundo determinante antigénico que se une específicamente a un segundo antígeno o un segundo epítipo en el mismo antígeno. En un modo de realización, el segundo epítipo en el mismo antígeno es un epítipo no solapante.

Se describen anticuerpos multiespecíficos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 o WO 2010/145793.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "antígeno libre" denota el antígeno que se puede unir específicamente mediante un determinante antigénico de un anticuerpo, pero que actualmente no está unido a este determinante antigénico. En un modo de realización, el antígeno libre es un antígeno no unido a anticuerpo o un antígeno que no forma complejo con anticuerpo.

Se usa el término "región Fc" en el presente documento para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, puede estar presente o no lisina en el extremo C (Lys447) de la región Fc. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^o ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

"Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia aminoácida que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoácidos de HVR no humanas y residuos aminoácidos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y típicamente dos, en que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicada en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se ubican en los residuos aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3 (Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^o ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242). Con la excepción de la CDR1 de la VH, las CDR comprenden generalmente los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos en regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3 (Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, arriba.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las

preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en el antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por haberse obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, pero no limitadas al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos naturales de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, estando descritos dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt, T.J. *et al.* Kuby Immunology, 6^a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, se pueden aislar anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente (véase, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

El término "anticuerpo anti-idiotipo" denota un anticuerpo que se une específicamente a un determinante antigénico tal como un sitio de unión de un anticuerpo precursor, es decir, que está dirigido, por ejemplo, contra un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo precursor. En un modo de realización, el anticuerpo anti-idiotipo se une específicamente a una o más de las CDR del anticuerpo precursor. El anticuerpo precursor es un anticuerpo multiespecífico terapéutico. En un modo de realización, el anticuerpo precursor es un anticuerpo biespecífico.

Dos epítopos se solapan si se detecta una reducción de la señal de un 50 % o más, en un modo de realización de un 75 % o más, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial (RPS) usando el anticuerpo inmovilizado y el antígeno soluble, o viceversa, con el epítipo en cuestión a una concentración de 20-50 nM y el anticuerpo cuyo solapamiento de epítopos se tiene que detectar a una concentración de 100 nM. De forma alternativa, se puede usar un procedimiento en el que se determina el solapamiento de epítopos de dos anticuerpos que se unen al mismo antígeno con ayuda de un sistema de ensayo competitivo. Para este propósito, por ejemplo, con ayuda de un inmunoensayo enzimático basado en células (ELISA) que emplea células que expresan epítopos de antígenos recombinantes, se analiza si el anticuerpo cuyo solapamiento de epítopos se tiene que detectar compete con el otro anticuerpo por la unión al antígeno inmovilizado. Para este propósito, se incuba el antígeno inmovilizado con el anticuerpo en forma marcada y en exceso del anticuerpo cuyo solapamiento de epítopos se tiene que detectar. Mediante la detección del marcador unido se puede averiguar fácilmente el solapamiento de epítopos. Si se determina una reducción de señal de más de un 70 %, en un modo de realización de más de un 80 %, a la misma concentración, o un desplazamiento de más de un 80 %, en un modo de realización de más de un 90 %, a concentraciones más altas, en un caso con un exceso de 10⁵ veces del anticuerpo cuyo solapamiento de epítopos se tiene que detectar, relativo al anticuerpo conocido, entonces existe solapamiento o identidad de epítopos y ambos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a uno solapante en el mismo antígeno.

Los principios de diferentes inmunoensayos se describen, por ejemplo, en D.S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R). Lu, B., *et al.* (Analyst 121 (1996) 29R-32R) e informan de la inmovilización orientada de anticuerpos para el uso en inmunoensayos. Se informa de inmunoensayos mediados por avidina-biotina, por ejemplo, en Wilchek, M., and Bayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469.

Los anticuerpos monoclonales y sus dominios constantes contienen como proteínas una serie de cadenas laterales reactivas para acoplarse a un ligando, tal como una superficie, una proteína, un polímero (por ejemplo, PEG, celulosa o poliestireno), una enzima o un miembro de una pareja de unión. Los grupos reactivos químicos de los anticuerpos son, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteínas y metioninas), grupos ácido carboxílico (ácidos aspárticos, ácidos glutámicos) y grupos alditol. Dichos procedimientos, por ejemplo, se describen en Aslam M., y Dent, A., "Bioconjugation", MacMillan Ref. Ltd. 1999, pp. 50-100.

Uno de los grupos reactivos más comunes de las proteínas es el ϵ -amino alifático del aminoácido lisina. En general, prácticamente todos los anticuerpos contienen abundante lisina. Las aminas de lisina son nucleófilos razonablemente buenos por encima de pH 8,0 ($pK_a = 9,18$) y, por lo tanto, reaccionan fácil y limpiamente con una variedad de reactivos para formar enlaces estables. Los compuestos reactivos con amino reaccionan principalmente con lisinas y los grupos α -amino de las proteínas. Los ésteres reactivos, particularmente los ésteres de N-hidroxi-succinimida (NHS), están entre los reactivos empleados más comúnmente para la modificación de grupos amino. El pH óptimo para la reacción en un entorno acuoso es pH 8,0 a 9,0. Los isotiocianatos son reactivos de modificación de aminas y forman enlaces de tiourea con las proteínas. Reaccionan con aminas proteicas en solución acuosa (óptimamente a pH de entre 9,0 y 9,5). Los aldehídos reaccionan en condiciones acuosas suaves con aminas

alifáticas y aromáticas, hidracinas e hidracidas para formar un intermedio de imina (base de Schiff). Se puede reducir selectivamente una base de Schiff con agentes reductores suaves o fuertes (tales como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio) para obtener un enlace de alquilamina estable. Otros reactivos que se han usado para modificar aminas son anhídridos de ácido. Por ejemplo, el anhídrido del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) es un agente quelante bifuncional que contiene dos grupos anhídrido reactivos con amina. Puede reaccionar con grupos de extremo N y ϵ -amino de proteínas para formar enlaces de amida. Los anillos de anhídrido se abren para crear brazos quelatantes de metal multivalentes que se pueden unir firmemente a metales en un complejo de coordinación.

Otro grupo reactivo común en los anticuerpos es el residuo tiol del aminoácido que contiene azufre cistina y su producto de reducción cisteína (o media cistina). La cisteína contiene un grupo tiol libre, que es más nucleófilo que las aminas y es generalmente el grupo funcional más reactivo en una proteína. Los tioles son generalmente reactivos a pH neutro, y, por lo tanto, se pueden acoplar selectivamente a otras moléculas en presencia de aminas. Puesto que los grupos sulfhidrilo libres son relativamente reactivos, las proteínas con estos grupos a menudo existen con ellos en su forma oxidada como grupos disulfuro o enlaces disulfuro. En dichas proteínas, se requiere la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditioneitol (DTT) para generar el tiol libre reactivo. Los compuestos reactivos con tiol son los que se acoplan a los grupos tiol de las proteínas, formando productos acoplados con tioéter. Estos reactivos reaccionan rápidamente a pH de ligeramente ácido a neutro y, por lo tanto, se pueden hacer reaccionar selectivamente en presencia de grupos amino. La bibliografía informa del uso de varios reactivos de reticulación tiolantes, tales como el reactivo de Traut (2-iminotiolano), (acetiltio)acetato de succinimidilo (SATA) y 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-LC-SPDP) para proporcionar maneras eficaces de introducir múltiples grupos sulfhidrilo por medio de grupos amino reactivos. Los derivados de haloacetilo, por ejemplo, yodoacetamidas, forman enlaces tioéter y también son reactivos para la modificación con tiol. Otros reactivos útiles son las maleimidias. La reacción de maleimidias con reactivos con tiol es esencialmente la misma que con yodoacetamidas. Las maleimidias reaccionan rápidamente a pH de ligeramente ácido a neutro.

Otro grupo reactivo común en los anticuerpos es el ácido carboxílico. Las proteínas contienen grupos ácido carboxílico en la posición de extremo C y en las cadenas laterales del ácido aspártico y ácido glutámico. La reactividad relativamente baja de los ácidos carboxílicos en agua habitualmente hace difícil el uso de estos grupos para modificar selectivamente proteínas y otras biomoléculas. Cuando se hace esto, el grupo ácido carboxílico habitualmente se convierte en un éster reactivo mediante el uso de una carbodiimida soluble en agua y se hace reaccionar con un reactivo nucleófilo, tal como una amina, hidracida o hidracina. El reactivo que contiene amina debe ser una base débil a fin de reaccionar selectivamente con el ácido carboxílico activado en presencia de las ϵ -aminas más básicas de la lisina para formar un enlace amida estable. Se puede producir la reticulación de proteínas cuando el pH se eleva por encima de 8,0.

Se puede usar peryodato de sodio para oxidar la parte alcohólica de un azúcar de un resto glucídico fijado a un anticuerpo a un aldehído. Se puede hacer reaccionar cada grupo aldehído con una amina, hidracida o hidracina como se describe para los ácidos carboxílicos. Puesto que el resto glucídico se encuentra predominantemente en la región del fragmento cristalizable (Fc) de un anticuerpo, se puede lograr la conjugación a través de la modificación dirigida al sitio del glucídico lejos del sitio de unión a antígeno. Se forma un intermedio de base de Schiff, que se puede reducir a una alquilamina a través de la reducción del intermedio con agentes reductores solubles en agua de cianoborohidruro de sodio (suave y selectivo) o borohidruro de sodio (fuerte).

El término "muestra" incluye, pero no está limitada a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o ser vivo anterior. Dichos seres vivos incluyen, pero no están limitados a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. En un modo de realización, la muestra se obtiene de un mono, especialmente un macaco cangrejero, o un conejo, o un ratón o rata. Dichas sustancias incluyen, pero no están limitadas a, sangre entera, suero o plasma de una persona, que son las fuentes de muestra más ampliamente usadas en la rutina clínica.

El término "fase sólida" denota una sustancia no líquida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y microesferas) preparadas de materiales tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias en gel tales como sílice, alúmina y geles poliméricos; capilares, que pueden estar preparados de polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros recipientes de muestras de espectrómetro. Un componente de fase sólida se distingue de las superficies sólidas inertes en que una "fase sólida" contiene al menos un resto en su superficie, que está destinado a interactuar con una sustancia en una muestra. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta o placa de microtitulación, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como microesferas y micropartículas. Se puede usar una variedad de micropartículas que permitan la fijación no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Dichas partículas incluyen partículas poliméricas tales como poliestireno y poli(metacrilato de metilo); partículas de oro tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas cerámicas tales como sílice, vidrio y partículas de óxido de metal. Véase, por ejemplo, Martin, CR, y col., Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327A, o Butler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23.

A partir de cromógenos (grupos fluorescentes o luminiscentes y colorantes), enzimas, grupos activos por RMN,

partículas de metal o haptenos, tales como digoxigenina, se selecciona el marcador detectable en un modo de realización. El marcador detectable también puede ser un grupo de reticulación fotoactivable, por ejemplo, un grupo azido o azirina. Los quelatos de metal que se pueden detectar mediante electroquimioluminiscencia también son en un modo de realización grupos emisores de señales, dándose particular preferencia a quelatos de rutenio, por ejemplo, un quelato de rutenio (bispiridilo)₃²⁺. Los grupos marcadores de rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138.

El término "proteína de unión multiespecífica terapéutica" denota una proteína de unión multiespecífica que está destinada para su uso en un ser humano. La proteína de unión multiespecífica es un anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico o biespecífico es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico o anticuerpo biespecífico es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.

El término "animal de experimentación" denota cualquier mamífero, por ejemplo, animales domésticos y de granja, así como primates superiores, pero excluye a los humanos. En un modo de realización, el procedimiento que se informa en el presente documento se realiza con una muestra obtenida a partir de un animal de experimentación seleccionado del grupo que comprende ratón, rata, conejo, cabra, oveja, perro, gato y primates como lémures, monos, títeres y simios. Si el animal de experimentación es un simio inferior, se excluyen los parientes más cercanos al hombre, los grandes simios, especialmente el grupo de chimpancés, bonobos, gorilas y orangutanes.

El término "proteína de unión multiespecífica terapéutica total" denota cualquier proteína de unión multiespecífica terapéutica presente en una muestra de un animal de experimentación independientemente de si la proteína de unión multiespecífica terapéutica es activa (es decir, todavía reactiva con su uno o más ligandos), inactiva y/o forma complejo con el ligando.

El término "proteína de unión multiespecífica terapéutica activa" denota la proteína de unión multiespecífica terapéutica presente en una muestra de un animal de experimentación que todavía se puede unir a uno o más de sus ligandos.

El término "proteína de unión multiespecífica terapéutica que forma complejo con su ligando" indica la proteína de unión multiespecífica terapéutica presente en una muestra de un animal de experimentación en el que al menos un determinante antigénico se une específicamente a su ligando.

En el presente documento se informa de un procedimiento de determinación inmunológica para la determinación de la cantidad de una proteína de unión multiespecífica en una muestra.

La determinación inmunológica se realiza como ensayo de doble captura usando una molécula de captura, una molécula trazadora y una molécula de detección.

La molécula de captura se une a una fase sólida. La molécula de captura puede ser cualquiera de un ligando de la proteína de unión multiespecífica (por ejemplo, uno de los antígenos de un anticuerpo biespecífico), un agente de formación de complejos general de la proteína de unión multiespecífica (por ejemplo, un receptor Fc en el caso de un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo anti-región Fc en el caso de un anticuerpo de longitud completa), o un primer ligando de una pareja de unión si la proteína de unión multiespecífica se derivatiza con el segundo ligando de una pareja de unión, o un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a una determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica.

La molécula de detección puede ser cualquiera de un ligando de la proteína de unión multiespecífica (por ejemplo, uno de los antígenos de un anticuerpo biespecífico, pero si se usa un antígeno como molécula de captura, se tiene que usar un antígeno diferente como molécula de detección), un agente de formación de complejos general de la proteína de unión multiespecífica (por ejemplo, un receptor Fc en el caso de un anticuerpo de longitud completa con la condición de que esta molécula ya no se use como molécula de captura o un anticuerpo anti-región Fc en el caso de un anticuerpo de longitud completa con la condición de que este anticuerpo se una a un epítipo diferente si también se usa la misma clase de anticuerpo como molécula de captura), o un primer ligando de una pareja de unión si la proteína de unión multiespecífica se derivatiza con el segundo ligando de una pareja de unión (con la condición de que se use una pareja de unión diferente que la usada para inmovilizar la molécula de captura), o un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica (con la condición de que este se una a un determinante antigénico diferente que un anticuerpo anti-idiotipo usado como molécula de captura).

Se ha descubierto ahora que para la determinación de la cantidad de una proteína de unión multiespecífica en una muestra es ventajoso usar un anticuerpo anti-idiotipo como molécula de captura y como molécula de detección, con lo que los anticuerpos anti-idiotipo se unen a diferentes determinantes antigénicos de la proteína de unión multiespecífica.

Mediante el uso de un anticuerpo anti-idiotipo como molécula de captura y como molécula de detección en la

determinación inmunológica de un anticuerpo multiespecífico en una muestra, el procedimiento es i) más robusto/sufre menos interferencia con respecto a las sustancias en la matriz de la muestra, ii) requiere menos dilución de la muestra, iii) se puede realizar más rápidamente, iv) es más flexible con respecto al marcaje/derivatización/inmovilización del anticuerpo de detección y/o de captura en comparación con un procedimiento que usa los antígenos de la proteína de unión multiespecífica como molécula de detección y de captura.

Se ha descubierto que la determinación inmunológica de la cantidad de una proteína de unión multiespecífica en una muestra, especialmente en una muestra que contiene plasma humano o suero obtenida a partir de un animal de experimentación, está fuertemente influenciada por la matriz de la muestra si se usan los antígenos de la proteína de unión multiespecífica como molécula de detección y de captura.

Si la muestra se obtiene a partir de un animal de experimentación en el que, por ejemplo, se lleva a cabo un estudio farmacocinético, la muestra también contendrá, además de la proteína de unión multiespecífica, otros componentes estrechamente relacionados derivados del animal de experimentación. Por ejemplo, si la muestra es suero obtenido a partir de la sangre de un animal de experimentación, también contendrá uno o más de los ligandos (por ejemplo, ligandos solubles de un receptor o moléculas de receptor desprendidas) de la proteína de unión multiespecífica (por ejemplo, los antígenos de un anticuerpo multiespecífico), inmunoglobulinas de diferentes subclases en una cantidad más alta o más baja que la de la proteína de unión multiespecífica, moléculas de formación de complejos no específicas, etc. Todas estas moléculas pueden interferir en un procedimiento de determinación inmunológica.

Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo biespecífico, la muestra también comprende, además del anticuerpo biespecífico, uno o ambos de los antígenos del anticuerpo biespecífico. Esto da como resultado la presencia de una mezcla de anticuerpo biespecífico libre, anticuerpo biespecífico que forma complejo con un antígeno, anticuerpo biespecífico que forma complejo con dos antígenos y cada una de las moléculas enumeradas anteriormente que forman complejos no específicos con otros componentes del plasma humano o suero. Se puede detectar el anticuerpo biespecífico libre con cualquier combinación posible de molécula de detección y de captura como se explica anteriormente. También se puede detectar principalmente el anticuerpo que forma complejo con antígeno con cualquiera de las combinaciones anteriores, pero la sensibilidad del procedimiento se reducirá a medida que se retire parte del anticuerpo biespecífico de la cantidad total de anticuerpo presente en la muestra, ya que el anticuerpo que forma complejo con antígeno está en un equilibrio con la forma que no forma complejo. La cantidad de anticuerpo que forma complejo con antígeno es altamente variable y, por eso, influye en el ensayo, también de manera altamente variable. Esto se puede contrarrestar, al menos parcialmente, usando tiempos de incubación prolongados, lo que, por otra parte, ralentiza la realización del ensayo.

Se ha descubierto ahora que se puede mejorar la sensibilidad de un procedimiento de determinación inmunológica de la cantidad de un anticuerpo biespecífico en una muestra de suero o plasma obtenida a partir de un animal de experimentación usando como molécula de captura y como molécula de detección un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a las CDR de los diferentes determinantes antigénicos del anticuerpo biespecífico. Asimismo, se puede reducir el tiempo requerido para realizar la determinación, ya que, entre otras cosas, no son necesarios tiempos de incubación prolongados a fin de desplazar el equilibrio de unión. Adicionalmente, se puede reducir la cantidad requerida de molécula de captura/densidad de la molécula de captura en la superficie sólida, ya que se puede capturar el anticuerpo biespecífico independientemente de la formación de complejos con antígeno y, de esta manera, se requiere menos molécula de captura.

Un aspecto que se informa en el presente documento es un procedimiento para determinar la cantidad o concentración de un anticuerpo multiespecífico terapéutico, especialmente un anticuerpo biespecífico, en una muestra obtenida a partir de un animal de experimentación que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- a) incubar una muestra con un primer anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico,
- b) incubar la muestra con un segundo anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, con lo que el segundo determinante antigénico es diferente del primer determinante antigénico y
- c) correlacionar el complejo formado en la etapa b) con la cantidad o concentración de la proteína de unión multiespecífica terapéutica.

En un modo de realización, la proteína de unión multiespecífica es un anticuerpo biespecífico.

En un modo de realización, el determinante antigénico es una pareja de un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo con su dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo análogo.

En un modo de realización, el ligando de uno o más determinantes antigénicos de la proteína de unión

multiespecífica es un antígeno. En un modo de realización, el antígeno se selecciona independientemente unos de otros para cada determinante antigénico a partir de antígenos solubles y antígenos unidos a membrana. En un modo de realización, el antígeno se selecciona independientemente unos de otros para cada determinante antigénico a partir de ligandos de receptores y receptores de la superficie celular.

5 El procedimiento es un inmunoensayo. El inmunoensayo es un inmunoensayo de tipo sándwich.

10 En un modo de realización, se realiza la conjugación de la proteína de unión multiespecífica a su ligando uniendo químicamente por medio de grupos de extremo N y/o ε-amino (lisina), grupos ε-amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólico de la cadena principal aminoacídica del anticuerpo y/o grupos alditol de la estructura glucídica del anticuerpo.

15 En un modo de realización, se inmoviliza el anticuerpo anti-idiotipo de captura por medio de una pareja de unión específica. En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo de captura con biotina y la inmovilización se realiza por medio de estreptavidina o avidina inmovilizada.

20 En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo de detección con el marcador detectable por medio de una pareja de unión específica. En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo de detección con digoxigenina y el enlace al marcador detectable se realiza por medio de un anticuerpo contra digoxigenina.

En un modo de realización, el animal de experimentación se selecciona del grupo que comprende los miembros de las familias de tities y tamarinos, monos del Viejo Mundo, lémures ratón y enanos, gibones y simios inferiores, lémures verdaderos, así como cruces de los mismos.

25 En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano o uno humanizado. En un modo de realización, el anticuerpo humano o humanizado es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, se detecta el anticuerpo terapéutico total, en otro se detecta el anticuerpo terapéutico activo y en un modo de realización se detecta el anticuerpo terapéutico unido a su antígeno.

30 En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo con una microesfera paramagnética.

En un modo de realización, se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo con una fase sólida.

35 Se pueden tener que evaluar diversos aspectos relacionados con la aplicación de una proteína de unión multiespecífica terapéutica en un animal de experimentación durante los estudios preclínicos. En determinadas configuraciones, puede ser pertinente analizar la cantidad total de proteína de unión multiespecífica terapéutica presente en una muestra, o puede ser importante analizar determinados fragmentos de una proteína de unión multiespecífica terapéutica en una muestra, determinadas modificaciones de una proteína de unión multiespecífica terapéutica en una muestra, la concentración de proteína de unión multiespecífica terapéutica en una muestra unida a su uno o más ligandos en la muestra, o la fracción de proteína de unión multiespecífica terapéutica en una muestra que todavía se puede unir a uno o más de sus ligandos. En un modo de realización, el procedimiento que se informa en el presente documento es para la detección de proteína de unión multiespecífica terapéutica total, o proteína de unión multiespecífica terapéutica activa, o proteína de unión multiespecífica terapéutica que forma complejo con su ligando, respectivamente.

45 Se puede detectar directamente la proteína de unión multiespecífica terapéutica total, activa o en forma de complejo con su ligando en un procedimiento como se informa en el presente documento.

50 Adicionalmente, también es posible evaluar indirectamente cualquier proteína de unión multiespecífica terapéutica "inactiva". Dicha proteína de unión multiespecífica terapéutica puede ser, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico terapéutico unido a uno o ambos de sus antígenos, o un anticuerpo biespecífico terapéutico unido a un antígeno de reactividad cruzada o un anticuerpo biespecífico terapéutico bloqueado por un autoanticuerpo contra el anticuerpo biespecífico terapéutico. En el caso de que la cantidad de la proteína de unión multiespecífica total sea mayor que la suma de proteína de unión multiespecífica activa y proteína de unión multiespecífica terapéutica que forma complejo con su ligando, habrá una fracción adicional de proteína de unión multiespecífica que comprende la proteína de unión multiespecífica inactiva no unida a su correspondiente ligando.

60 Están disponibles diversos sistemas de ensayo para analizar, por ejemplo, una proteína de unión multiespecífica terapéutica total, activa o en forma de complejo con su ligando.

Por ejemplo, se puede detectar la proteína de unión multiespecífica total en un sistema denominado de inmunoensayo competitivo o en un sistema de ensayo denominado de tipo sándwich.

65 Se puede realizar dicho ensayo sin etapas de lavado (inmunoensayo homogéneo) o con etapas de lavado (inmunoensayo heterogéneo).

En el presente documento se detecta la cantidad de proteína de unión multiespecífica terapéutica total en un

- inmunoensayo de tipo sándwich, en el que se usa un anticuerpo anti-idiotipo en ambos lados de dicho ensayo de tipo sándwich, con lo que los dos anticuerpos anti-idiotipo se unen específicamente a diferentes determinantes antigénicos de la proteína de unión multiespecífica. El anticuerpo anti-idiotipo usado en un lado de dicho sándwich se une o se puede unir a una fase sólida (a menudo se denomina anticuerpo anti-idiotipo de captura), mientras que el anticuerpo anti-idiotipo en el otro lado de dicho sándwich se marca de tal manera que se facilite la detección directa o indirecta (se denomina anticuerpo anti-idiotipo de detección). La cantidad de anticuerpo anti-idiotipo de detección unido en dicho procedimiento de ensayo de tipo sándwich se correlaciona directamente con la cantidad de proteína de unión multiespecífica terapéutica en la muestra investigada.
- En la técnica (por ejemplo, el documento US 2003/0068664) se conocen sistemas de ensayo que permiten la detección de anticuerpos terapéuticos activos. Dichos sistemas requieren la unión del antígeno a una fase sólida, la unión del anticuerpo terapéutico a este antígeno unido y la detección del anticuerpo terapéutico unido por medio del antígeno a la fase sólida.
- Se puede lograr la detección de la proteína de unión multiespecífica activa en una muestra mediante procedimientos del estado de la técnica convenientes. Sin embargo, la detección de la proteína de unión multiespecífica terapéutica total o de la fracción de proteína de unión multiespecífica terapéutica que forma complejo con su ligando es bastante complicada y requiere configuraciones de ensayo muy diferentes y especialmente requiere reactivos preparados a medida para cada uno de los diferentes ensayos. Con el procedimiento que se informa en el presente documento es posible evaluar la fracción de proteína de unión multiespecífica terapéutica activa, proteína de unión multiespecífica terapéutica total o proteína de unión multiespecífica terapéutica que forma complejo con su ligando en sistemas de prueba que son análogos entre sí. Por su propia naturaleza, esta clase de evaluación comparativa de proteína de unión multiespecífica terapéutica activa, total o en forma de complejo con su ligando debe tener ventajas una vez que se hacen comparaciones cuantitativas entre estas diversas fracciones de proteína de unión multiespecífica terapéutica.
- Se puede disponer un formato de ensayo de tipo sándwich para detectar la proteína de unión multiespecífica terapéutica activa. En un modo de realización, se usa el anticuerpo anti-idiotipo que se une a un determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica terapéutica como anticuerpo anti-idiotipo de captura y la parte de detección de dicho ensayo de tipo sándwich hace uso de un antígeno, que se une específicamente mediante otro determinante antigénico respectivo de la proteína de unión multiespecífica, en una forma marcada, o de forma alternativa, después de la unión de un antígeno, que se une específicamente mediante otro determinante antigénico respectivo de la proteína de unión multiespecífica, hace uso de un segundo anticuerpo que no se une ni compite con el epítipo reconocido por la proteína de unión multiespecífica terapéutica, en el que el segundo anticuerpo es específicamente detectable y/o está marcado de tal manera que se facilite la detección directa o indirecta.
- Se puede detectar la proteína de unión multiespecífica terapéutica que forma complejo con su ligando en un formato de ensayo de tipo sándwich usando un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica como un anticuerpo anti-idiotipo de captura. En la detección se usa un segundo anticuerpo que se une al ligando que se une específicamente mediante un determinante antigénico diferente de la proteína de unión multiespecífica en un epítipo que no compite con el epítipo de la proteína de unión multiespecífica terapéutica. En un modo de realización, dicho segundo anticuerpo se marca de tal manera que se facilite la detección directa o indirecta.
- Para la detección directa, el grupo marcador se puede seleccionar de cualquier grupo marcador detectable conocido, tal como colorantes, grupos marcadores luminiscentes, tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo, ésteres de acridinio o dioxetanos, o colorantes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y sus derivados. Otros ejemplos de grupos marcadores son complejos de metal luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo, las usadas para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo donante de enzima clonada) y radioisótopos. En un modo de realización, los quelatos de metal que se pueden detectar mediante electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales usados como marcadores detectables, dándose particular preferencia a quelatos de rutenio. En un modo de realización, el grupo marcador es un quelato de rutenio (bispíridilo)₃²⁺.
- Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo, el anticuerpo anti-idiotipo de detección, se marque con un primer ligando de una pareja de unión bioafín. Los ejemplos de parejas de unión adecuadas son hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina, tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. En un modo de realización, los primeros miembros de parejas de unión comprenden hapteno, antígeno y hormona. En un modo de realización, el hapteno se selecciona del grupo que comprende digoxigenina, teofilina, carborano y biotina, así como análogos de los mismos. El segundo ligando de dicha pareja de unión, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., se marca habitualmente para permitir la detección directa, por ejemplo, mediante los marcadores que se mencionan anteriormente.
- Los inmunoensayos se conocen bien por el experto en la técnica. Se resumen procedimientos para llevar a cabo

dichos ensayos, así como aplicaciones prácticas y procedimientos en libros de texto relacionados. Los ejemplos de libros de texto relacionados son Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) 221-278, eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam) y diversos volúmenes de "Methods in Enzymology", eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press), que tratan sobre procedimientos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

En todos los procedimientos de detección inmunológica anteriores se eligen condiciones para los reactivos que permitan la unión de los reactivos empleados, por ejemplo, la unión de un anticuerpo a su antígeno correspondiente. El experto en la técnica se refiere al resultado de dicho acontecimiento de unión usando el término complejo. El complejo formado en un procedimiento de ensayo de acuerdo con la presente invención se correlaciona por procedimientos del estado de la técnica con la concentración correspondiente de la proteína de unión multiespecífica terapéutica en la muestra. Dependiendo del reactivo de detección empleado, esta etapa de correlación dará como resultado la concentración de proteína de unión multiespecífica terapéutica total, activa o en forma de complejo con su ligando.

Debido al uso de uno y el mismo reactivo, el anticuerpo anti-idiotipo en los diferentes ensayos, los valores obtenidos se pueden comparar fácilmente entre sí e incluso evaluar las proporciones de los mismos. Se puede relacionar el procedimiento en el presente documento con la proporción de proteína de unión multiespecífica terapéutica activa con respecto a la total. Esta proporción también puede servir como un indicador de la eficacia de una proteína de unión multiespecífica terapéutica.

En el presente documento se informa de un aspecto de un procedimiento para la determinación inmunológica de la cantidad de una proteína de unión multiespecífica en una muestra que comprende la etapa de:

- determinar la cantidad de un complejo formado entre

i) un primer anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica, y

ii) la proteína de unión multiespecífica

incubar el complejo con un segundo anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica, que es diferente del primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico, y

determinar así la cantidad de la proteína de unión multiespecífica en la muestra.

En un modo de realización, la determinación de la cantidad de la proteína de unión multiespecífica es mediante un inmunoensayo de doble captura. En un modo de realización, el inmunoensayo comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, en el que el anticuerpo de captura se conjuga con una fase sólida y el anticuerpo de detección se conjuga con un marcador detectable. En un modo de realización, el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son ambos anticuerpos anti-idiotipo que se unen a diferentes determinantes antigénicos de la proteína de unión multiespecífica.

En un modo de realización, el anticuerpo de captura se conjuga con una fase sólida.

En un modo de realización, el anticuerpo de detección comprende un marcador detectable.

El anticuerpo de captura anti-idiotipo útil en un procedimiento que se informa en el presente documento se puede conjugar a una fase sólida. En un modo de realización, la conjugación se realiza mediante unión química por medio de grupos N-terminales y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólico de la cadena principal aminoacídica del anticuerpo y/o grupos alditol de la estructura glucídica del anticuerpo. En un modo de realización, el anticuerpo de captura anti-idiotipo es una mezcla de al menos dos anticuerpos conjugados con una fase sólida, en el que los al menos dos anticuerpos conjugados con una fase sólida difieren en el sitio en el que están conjugados con la fase sólida. Por ejemplo, la mezcla de al menos dos anticuerpos conjugados con una fase sólida puede comprender un anticuerpo conjugado por medio de un aminoácido de la cadena principal aminoacídica del anticuerpo con la fase sólida y un anticuerpo conjugado por medio de un grupo alditol de una estructura glucídica del anticuerpo con la fase sólida. También, por ejemplo, la mezcla de al menos dos anticuerpos conjugados con una fase sólida puede comprender anticuerpos conjugados con la fase sólida por medio de diferentes residuos aminoacídicos de su cadena principal aminoacídica. La expresión "residuo aminoacídico diferente" denota dos clases diferentes de aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina y ácido aspártico, o tirosina y ácido glutámico, o bien dos residuos aminoacídicos de la cadena principal aminoacídica que difieren en su posición en la secuencia aminoacídica del anticuerpo. En este último caso, el aminoácido puede ser de la misma clase o de diferente clase. La expresión "difieren en el sitio de anticuerpo" denota una diferencia en la clase de sitio, por ejemplo, grupo aminoácido o alditol, o bien en el número del aminoácido de la cadena principal

aminoacídica, por ejemplo, en que se conjuga el anticuerpo conjugado con la fase sólida. Lo mismo se aplica al contrario al anticuerpo de detección útil en un procedimiento que se informa en el presente documento.

5 En un modo de realización del procedimiento, el inmunoensayo comprende un anticuerpo de captura, un anticuerpo trazador y un anticuerpo de detección, en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo anti-idiotipo biotinilado que se une específicamente a un primer determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica conjugado con una fase sólida por medio de estreptavidina, el anticuerpo de detección es un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica que es diferente del primer determinante antigénico conjugado con digoxigenina y el anticuerpo de detección es un anticuerpo contra digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante.

En un modo de realización, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

15 - incubar una muestra que comprende una proteína de unión multiespecífica con un primer anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica, con lo que se forma un complejo entre el primer anticuerpo anti-idiotipo y la proteína de unión multiespecífica,

20 - incubar el complejo entre el anticuerpo de captura anti-idiotipo y la proteína de unión multiespecífica con un segundo anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico de la proteína de unión multiespecífica que no sea idéntica, es decir, que sea diferente al determinante antigénico al que se une el primer anticuerpo anti-idiotipo, con lo que se forma un complejo entre el primer anticuerpo anti-idiotipo, la proteína de unión multiespecífica y el segundo anticuerpo anti-idiotipo, y

25 - determinar la cantidad del complejo formado en la etapa previa.

En un modo de realización, la determinación de la cantidad de la proteína de unión multiespecífica es usando una curva de calibración.

30 En un modo de realización, el segundo anticuerpo anti-idiotipo se conjuga con un marcador detectable.

En un modo de realización, la determinación de la cantidad de la proteína de unión multiespecífica es determinando la cantidad de marcador detectable inmovilizado.

35 En un modo de realización, la proteína de unión multiespecífica es una proteína de unión biespecífica. En un modo de realización, la proteína de unión biespecífica es un anticuerpo biespecífico.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figura para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Procedimiento general para la determinación de la cantidad de un anticuerpo biespecífico en una muestra

45 Se determinaron las concentraciones de la proteína de unión multiespecífica/anticuerpo biespecífico con un ensayo de inmunoadsorción (ELISA).

50 Para la cuantificación de anticuerpos biespecíficos en muestras de suero o plasma de ratón y lisados oculares, se realizó un inmunoensayo de tipo sándwich en serie en fase sólida con anticuerpos anti-idiotipo monoclonales biotinilados y digoxigenados contra los diferentes determinantes antigénicos del anticuerpo biespecífico como anticuerpos de captura y detección a fin de verificar la integridad de la biespecificidad del anticuerpo biespecífico. En esta configuración, para un anticuerpo anti-VEGF/ANG2 biespecífico, el anticuerpo de captura anti-idiotipo biotinilado se une específicamente al sitio de unión a VEGF, mientras que el anticuerpo de detección anti-idiotipo digoxigenado se une específicamente al sitio de unión a ANG2. Se detectó el complejo inmunitario unido del anticuerpo de captura, anticuerpo biespecífico y anticuerpo de detección en la fase sólida de la placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (SA-MTP) con una peroxidasa de rábano picante acoplada a un anticuerpo anti-digoxigenina. Después de lavar el material no unido de la SA-MTP y adición de sustrato ABTS, la señal conseguida fue proporcional a la cantidad de anticuerpo biespecífico unido en la fase sólida de la SA-MTP. Se hizo la cuantificación convirtiendo las señales medidas de las muestras en concentraciones referenciadas a los calibradores analizados en paralelo.

Configuración para la detección de un anticuerpo anti-VEGF/ANG2 biespecífico

65 En una primera etapa, se recubre la SA-MTP con 100 µl/pocillo de la solución de anticuerpo de captura anti-idiotipo biotinilado (anticuerpo anti-anticuerpo anti-VEGF M-2.45.51-Bi) con una concentración de 1 µg/ml durante una hora a

500 rpm en un agitador de MTP. Mientras tanto, se prepararon los calibradores, las muestras de CC y las muestras. Se diluyeron los calibradores y las muestras de CC hasta obtener una matriz de suero al 2 %. Se diluyeron las muestras hasta que las señales estuvieron en el intervalo lineal de los calibradores.

- 5 Después de recubrir la SA-MTP con anticuerpo de captura anti-idiotipo, se lavó tres veces la placa con 300 µl/pocillo de tampón de lavado. Posteriormente se pipetearon 100 µl/pocillo de los calibradores, muestras de CC y muestras en la SA-MTP y se incubaron durante una hora a 500 rpm.

10 El anticuerpo anti-VEGF/ANG2 biespecífico estaba ahora unido a su sitio de unión a VEGF por medio del anticuerpo de captura de anticuerpo anti-VEGF anti-idiotipo a la fase sólida de la SA-MTP. Después de la incubación, se eliminó el analito no unido lavando la placa. Posteriormente, se añadió 100 µl/pocillo del anticuerpo de detección anti-idiotipo (anticuerpo anti-anticuerpo anti-ANG2 M-2.6.81-Dig) con una concentración de 250 ng/ml a los pocillos de la SA-MTP. Luego, se incubó la placa durante una hora a 500 rpm en un agitador. Después del lavado, se añadió 100 µl/pocillo del segundo anticuerpo de detección (conjugado de anticuerpo policlonal anti-digoxigenina-Fab-POD) a una concentración de 50 mU/ml a los pocillos de la SA-MTP y se incubó la placa durante una hora a 500 rpm. Después de una etapa de lavado final para eliminar el exceso del segundo anticuerpo de detección, se añadió 100 µl/pocillo de sustrato (ABTS). El conjugado de anticuerpo-POD cataliza la reacción de color del sustrato ABTS®. Entonces se midió la señal mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm ([405/490] nm)).

20 **Ejemplo 2**

25 **Uso de un ensayo de acuerdo con el ejemplo 1 para la caracterización farmacocinética de un anticuerpo biespecífico en ratones con FcRn transgénicos para FcRn humano**

25 Fase *in vivo*

El estudio incluyó ratones C57BL/6J hembra (fondo), que eran ratones deficientes en FcRn y transgénicos hemigénicos para FcRn humano (huFcRn, línea 276 -/tg).

30 Parte 1

35 A todos los ratones se les inyectó una vez por vía intravítrea en el ojo derecho 2 µl/animal de la solución apropiada (es decir, 21 µg de compuesto/animal (anticuerpo anti-VEGF/ANG2 sin las mutaciones I253A, H310A y H435A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), véase el documento EP 12176299.1 para detalles adicionales con respecto a los anticuerpos y secuencias aminoacídicas usadas) o 23,6 µg de compuesto/animal (anticuerpo anti-VEGF/ANG2 que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat)).

40 Se asignaron los ratones a 2 grupos con 6 animales cada uno. Se tomaron muestras de sangre del grupo 1 a las 2, 24 y 96 horas y del grupo 2 a las 7, 48 y 168 horas después de la aplicación del anticuerpo biespecífico respectivo. Se realizó la inyección en el humor vítreo del ojo derecho del ratón usando el sistema de microjeringuilla NanoFil para inyección de nanolitros de World Precision Instruments, Inc., Berlín (Alemania). Se anestesiaron los ratones con isoflurano al 2,5 % y para la visualización del ojo del ratón se usó un microscopio Leica MZFL 3 con un aumento de 45 40 veces y un anillo de luz con una iluminación Leica KL 2500 LCD. Posteriormente, se inyectaron 2 µl del compuesto usando una aguja de calibre 35.

Se extrajo sangre del plexo venoso retroocular del ojo contralateral de cada animal para la determinación de los niveles de compuesto en suero.

50 Se obtuvieron muestras de suero de al menos 50 µl a partir de sangre después de 1 hora a temperatura ambiente mediante centrifugación (9.300 x g) a 4 °C durante 3 min. Se congelaron las muestras de suero directamente después de la centrifugación y se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

55 Los ojos tratados de los animales del grupo 1 se aislaron 96 horas después del tratamiento y los ojos tratados de los animales del grupo 2 se aislaron 168 horas después del tratamiento.

Las muestras se almacenan congeladas a -80 °C hasta su análisis.

60 Parte 2

65 A todos los ratones se les inyectó una vez por vía intravenosa en la vena de la cola 200 µl/animal de la solución apropiada (es decir, 21 µg de compuesto/animal (anticuerpo anti-VEGF/ANG2 sin las mutaciones I253A, H310A y H435A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) o 23,6 µg de compuesto/animal (anticuerpo anti-VEGF/ANG2 que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat)).

Se asignaron los ratones a 2 grupos con 5 animales cada uno. Se tomaron muestras de sangre del grupo 1 a las 1, 24 y 96 horas y del grupo 2 a las 7, 48 y 168 horas después de la aplicación del anticuerpo biespecífico respectivo. Se extrajo sangre del plexo venoso retroocular de cada animal para la determinación de los niveles de compuesto en suero.

Se obtuvieron muestras de suero de al menos 50 µl a partir de sangre después de 1 hora a temperatura ambiente mediante centrifugación (9.300 x g) a 4 °C durante 3 min. Se congelaron las muestras de suero directamente después de la centrifugación y se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

Preparación de lisados oculares completos (ratones)

Se consiguieron los lisados oculares mediante disgregación físico-química de todo el ojo de animales de laboratorio. Para la disgregación mecánica, se transfirió cada ojo a un microfrasco de 1,5 ml con fondo cónico. Después de la congelación y la descongelación, se lavaron una vez los ojos con 1 ml de tampón de lavado celular (Bio-Rad, Bio-Plex Cell Lysis Kit, n.º de cat. 171-304011). En la siguiente etapa, se añadió 500 µl de tampón de lisis celular recién preparado y se molieron los ojos usando una mano de mortero de molienda de tejido de 1,5 ml (Kimble Chase, mano de mortero de 1,5 ml, art. n.º 749521-1500). Entonces, la mezcla se congeló y descongeló cinco veces y se molió de nuevo. Para separar el lisado del tejido restante, se centrifugaron las muestras durante 4 min a 4500 g. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su análisis posterior en el ELISA de cuantificación.

Análisis

Se realizó la determinación de la cantidad de anticuerpo biespecífico en la muestra de acuerdo con el ejemplo 1.

Evaluación farmacocinética

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental, usando el programa de evaluación farmacocinética WinNonlin™ (Pharsight), versión 5.2.1.

Resultados

A) Concentraciones en suero

Los resultados para las concentraciones en suero se muestran en las tablas 1 a 2.

Tabla 1: Comparación de las concentraciones en suero después de la aplicación intravítrea e intravenosa de anticuerpos anti-VEGF/ANG2 sin las mutaciones I253A, H310A y H435A.

	concentración en suero después de la aplicación intravítrea		concentración en suero después de la aplicación intravenosa	
ID	concentración [µg/ml]	media	concentración [µg/ml]	media
1 h			17,7	
2 h	9,8			
7 h	10,4		12,1	
24 h	6,4		8,3	
48 h	6,5		6,9	
96 h	3,4		4,1	
168 h	2,9		2,7	

Tabla 2: Comparación de las concentraciones en suero después de la aplicación intravítrea e intravenosa de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 con las mutaciones I253A, H310A y H435A.

	concentración en suero después de la aplicación intravítrea		concentración en suero después de la aplicación intravenosa	
ID	concentración [µg/ml]	media	concentración [µg/ml]	media
1 h			18,4	
2 h	7,0			

7 h	8,7	10,0
24 h	2,2	3,3
48 h	1,0	1,0
96 h	0,1	0,1
168 h	0,0	0,0

B) Concentraciones en los lisados oculares de los ojos izquierdo y derecho

Los resultados para las concentraciones en lisados oculares se muestran en las tablas 3 a 4.

5 **Tabla 3a:** Concentraciones de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 sin las mutaciones I253A, H310A y H435A en lisados oculares después de la aplicación intravítrea en el ojo derecho.

valores de concentración media de n = 6 ratones		
ID		concentración media [ng/ml]
96 h	ojo izquierdo	8,7
	ojo derecho	46,1
168 h	ojo izquierdo	4,3
	ojo derecho	12,9

10 **Tabla 3b:** Concentraciones de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 sin las mutaciones I253A, H310A y H435A en lisados oculares después de la aplicación intravenosa.

valores de concentración media de n = 5 ratones		
ID		concentración media [ng/ml]
96 h	ojo izquierdo	4,2
	ojo derecho	7,5
168 h	ojo izquierdo	3,4
	ojo derecho	6,1

15 **Tabla 4a:** Concentraciones de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 con las mutaciones I253A, H310A y H435A en lisados oculares después de la aplicación intravítrea en el ojo derecho.

valores de concentración media de n = 5 ratones		
ID		concentración media [ng/ml]
96 h	ojo izquierdo	0,3
	ojo derecho	34,5
168 h	ojo izquierdo	0,1
	ojo derecho	9,0

20 **Tabla 4b:** Concentraciones de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 con las mutaciones I253A, H310A y H435A en lisados oculares después de la aplicación intravenosa.

valores de concentración media de n = 5 ratones		
ID		concentración media [ng/ml]
96 h	ojo izquierdo	0,0
	ojo derecho	0,1
168 h	ojo izquierdo	0,0
	ojo derecho	0,1

Ejemplo 3

Ensayo para la caracterización farmacocinética de anticuerpos biespecíficos

25 Se analizaron el mismo conjunto de muestras que comprendían un anticuerpo anti-VEGF/ANG2 en plasma humano/EDTA al 10 % con un ELISA basado en antígenos (A) y un ELISA basado en anticuerpos anti-idiotipo (B).

ELISA basado en antígenos para la detección de anticuerpo anti-VEGF/ANG2:

30 Se recubrió directamente angiopoyetina 2 humana recombinante (ANG2) a una placa de microtitulación Maxisorb durante una hora, en la primera etapa. En paralelo, se preincubó el VEGF humano recombinante marcado con

digoxigenina con las muestras que contenían cantidades no conocidas de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 o patrones de referencia, respectivamente. Se diluyeron por un factor de 10 las muestras antes de la preincubación con VEGF marcado con digoxigenina. Después del recubrimiento y lavado de la placa de microtitulación, se pipeteó la solución preincubada de anticuerpo anti-VEGF/ANG2 y VEGF marcado con digoxigenina en la placa de microtitulación y se incubó durante otra hora. Se unieron los anticuerpos anti-VEGF/ANG2 unidos a VEGF marcado con digoxigenina a partir de la solución de preincubación a ANG2 inmovilizada. Después de otra etapa de lavado, se añadió un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con HRP (marcado con peroxidasa de rábano picante) a la placa y se incubó durante otra hora. Posteriormente, la placa se lavó y se añadió solución de sustrato ABTS para activar una reacción de color (véase la figura 2).

ELISA basado en anticuerpos anti-idiotipo para la detección de anticuerpo anti-VEGF/ANG2:

En una primera etapa, se recubrió la SA-MTP (placa de microtitulación recubierta con estreptavidina) con una solución de anticuerpo de captura anti-idiotipo biotinilado (anticuerpo anti-anticuerpo anti-VEGF (M-2.45.51-BI)). Mientras tanto, se prepararon los calibradores, las muestras de control (muestras de CC) y las muestras. Se diluyeron los calibradores y las muestras de CC hasta obtener una matriz de plasma de macaco cangrejero al 10 %. Se diluyeron las muestras hasta que las señales estuvieron en el intervalo lineal de los calibradores.

Después de recubrir la SA-MTP con anticuerpo de captura anti-idiotipo, se lavó tres veces la placa. Posteriormente se pipetearon las muestras de CC y muestras en la SA-MTP y se incubaron durante una hora a 500 rpm.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/ANG2 se unió por medio de su sitio de unión a VEGF al anticuerpo de captura del anticuerpo anti-VEGF anti-idiotipo a la fase sólida de la SA-MTP. Después de la incubación, se eliminó el analito no unido lavando la placa. Posteriormente, se añadió el anticuerpo de detección anti-idiotipo (anticuerpo anti-anticuerpo anti-ANG2 (M-2.6.81-DIG), 0,5 µg/ml) a los pocillos de la SA-MTP. Luego, se incubó la placa durante una hora a 500 rpm en un agitador. Después del lavado, se añadió el segundo anticuerpo de detección (conjugado de anticuerpo policlonal anti-digoxigenina-Fab-POD (POD=peroxidasa)) a los pocillos de la SA-MTP y se incubó la placa durante una hora a 500 rpm. Después de una etapa de lavado final para eliminar el exceso del segundo anticuerpo de detección, se añadió sustrato (ABTS). El conjugado de anticuerpo-POD cataliza la reacción de color del sustrato ABTS®. Entonces se midió la señal mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm ([405/490] nm)). Se midieron las señales de DO de los patrones de calibración desde 0,1-30 ng/ml en plasma humano al 10 % a 405 nm.

Tabla 5: Comparación del ensayo (A) y el ensayo (B) para la detección del anticuerpo anti-VEGF/ANG2.

(ng/ml)	ensayo basado en antígenos	ensayo basado en anticuerpos anti-idiotipo
30	0,963	2,282
15	0,296	1,982
7,5	0,117	1,493
3,75	0,077	0,930
1,88	0,037	0,506
0,94	0,036	0,292
0,47	0,032	0,169
0,23	0,031	0,098
0,12	0,030	0,065
0,06	0,030	0,047
0,03	0,030	0,037
0,01	0,030	0,032
0	0,030	0,033

Las curvas de calibración obtenidas con los diferentes ensayos (A) y (B) se muestran en la figura 3.

A partir de la figura 4 se puede observar que el ensayo basado en anticuerpos anti-idiotipo proporciona resultados comparables en presencia de suero humano al 5 %, 10 % y 20 %, mientras que el ensayo basado en antígenos muestra grandes desviaciones.

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la determinación de la cantidad total de un anticuerpo multiespecífico terapéutico en una muestra de suero o plasma en un inmunoensayo de tipo sándwich que comprende la etapa de:

10 - determinar la cantidad de un complejo formado entre i) un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, y ii) el anticuerpo multiespecífico terapéutico incubando el complejo con un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, que es diferente del primer determinante antigénico y determinar así la cantidad del anticuerpo multiespecífico terapéutico en la muestra,

15 en el que se conjuga el anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un primer determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico con una fase sólida,

en el que se marca el anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico, y

20 en el que la cantidad del anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a un segundo determinante antigénico del anticuerpo multiespecífico terapéutico unido se correlaciona directamente con la cantidad de anticuerpo multiespecífico terapéutico en la muestra.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, caracterizado por que el anticuerpo multiespecífico terapéutico es un anticuerpo biespecífico.

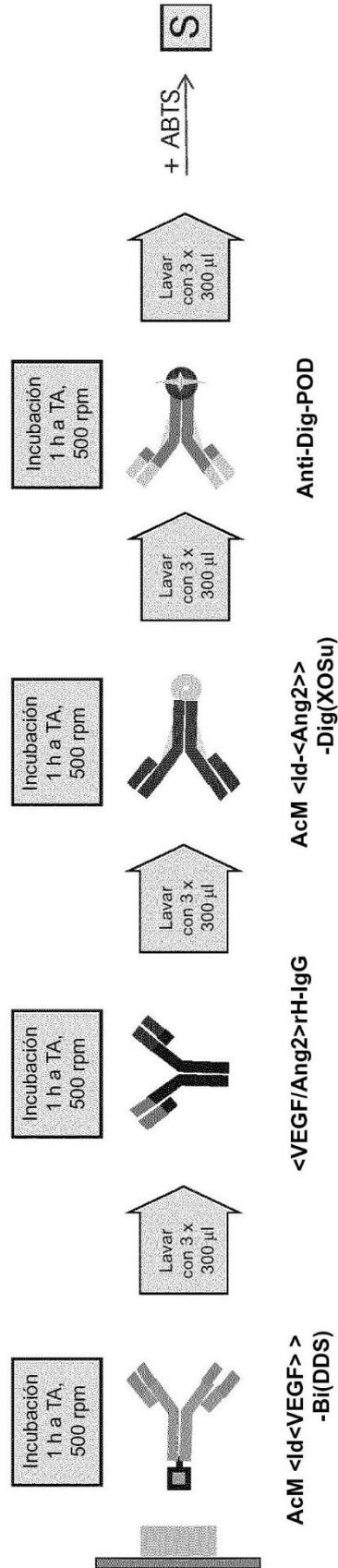


Fig. 1

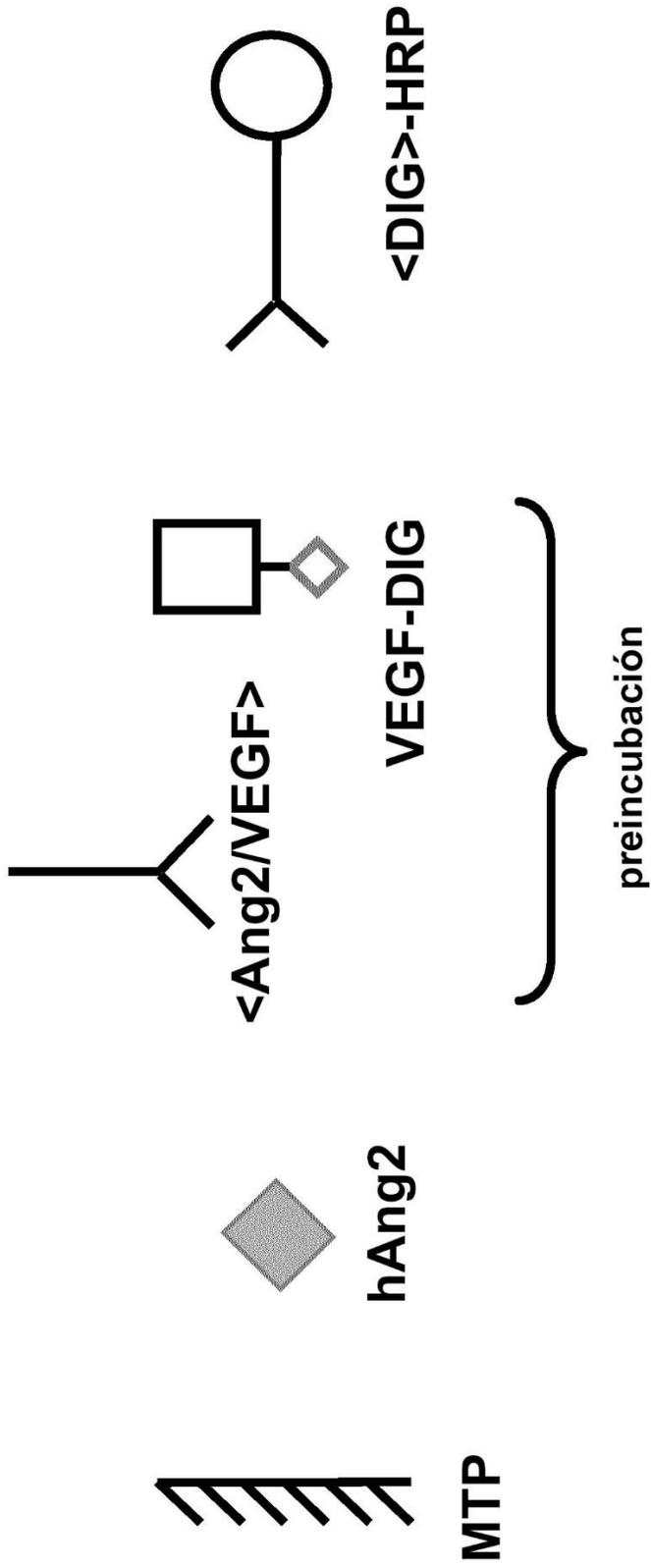


Fig. 2

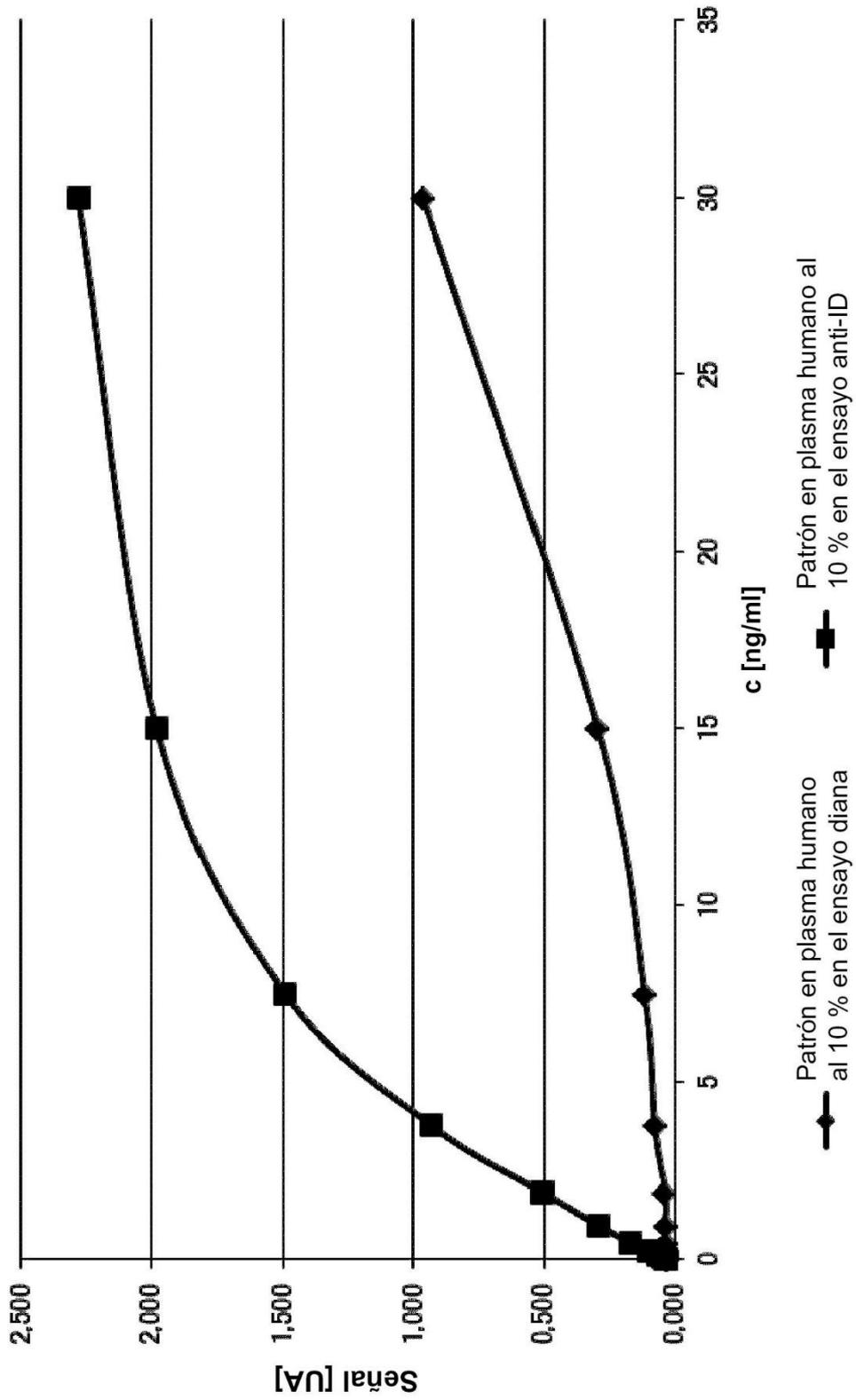


Fig. 3

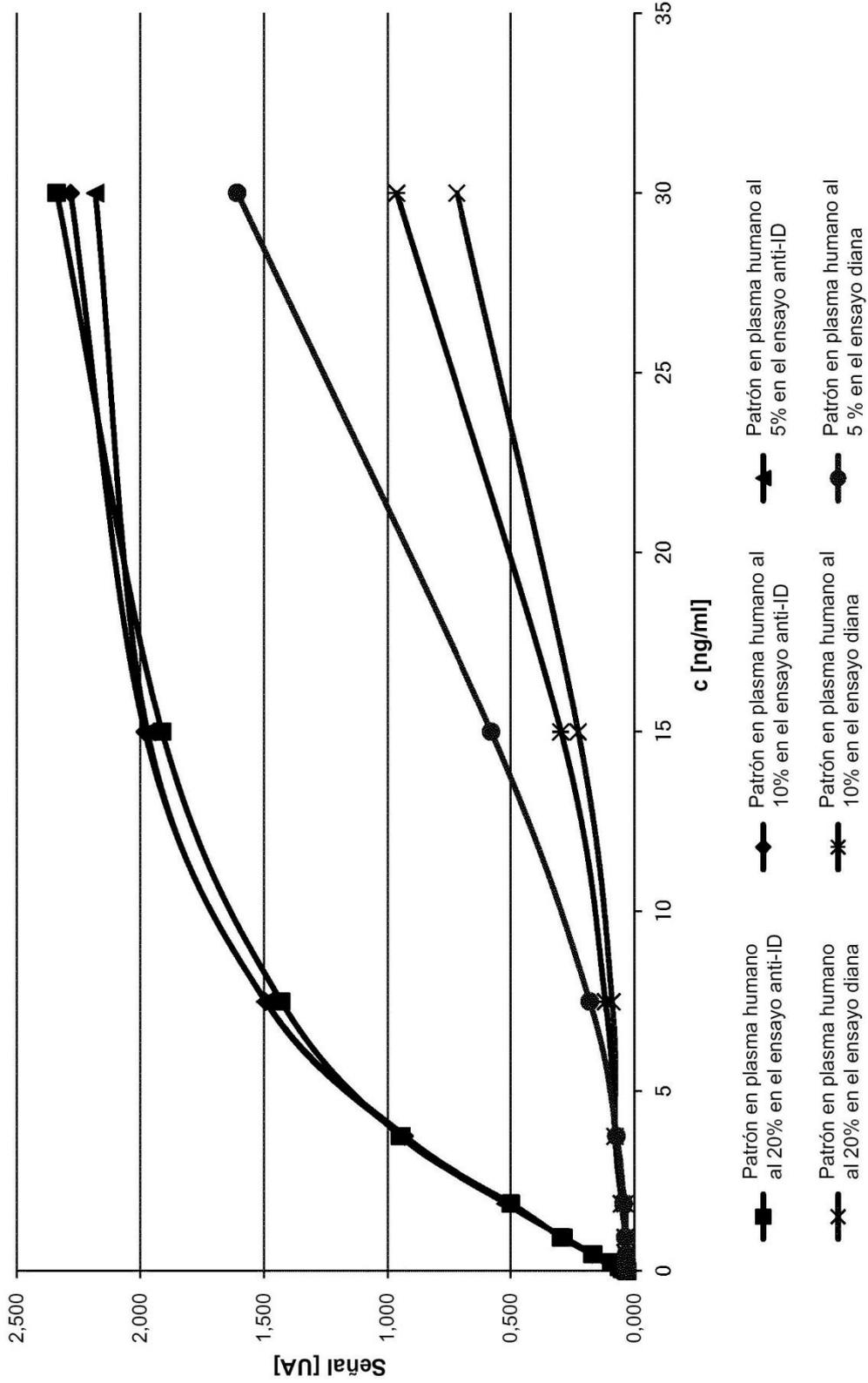


Fig. 4