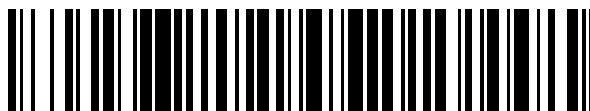


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 839**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2010 PCT/EP2010/065617**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11048043**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2010 E 10766278 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2491397**

54 Título: **Anticuerpos anti-IgG sin reactividad cruzada**

30 Prioridad:

19.10.2009 EP 09013144

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

04.08.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ESSIG, ULRICH;

KLOSTERMANN, STEFAN;

KOWALEWSKY, FRANK;

STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR;

VOGEL, RUDOLF y

WESSELS, UWE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 628 839 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

Anticuerpos anti-IgG sin reactividad cruzada

- 5 En el presente documento se informa de anticuerpos que se unen específicamente a la región constante de un fragmento Fab de IgG de anticuerpos humanos y de chimpancé de la clase IgG y de su uso en inmunoensayos.

Antecedentes de la invención

- 10 Desde el desarrollo de los primeros anticuerpos monoclonales por Koehler y Milstein en 1974, se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de anticuerpos que son apropiados para tratamiento en seres humanos. Los primeros anticuerpos monoclonales que estuvieron disponibles se habían desarrollado en ratones y ratas. En los últimos diez años, ha llegado al mercado un número cada vez mayor de anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpos monoclonales humanizados. Ejemplos bien conocidos incluyen, por ejemplo, Herceptin® y MabThera® de F. Hoffmann-La Roche AG, Basilea.

- 15 Un número bastante significativo de anticuerpos monoclonales humanos o humanizados está en investigación y necesitan estudiarse en animales de experimentación antes de que se pueda considerar la entrada en humanos para los primeros ensayos. Se deben estudiar criterios importantes como la biodisponibilidad y la depuración de los anticuerpos, por mencionar solo dos de ellos. Muchos de estos estudios requieren la cuantificación del anticuerpo terapéutico en un fondo de anticuerpos del propio animal de experimentación. En la mayoría de los casos se utilizan mamíferos como animales de experimentación. A menudo, la toxicología se evalúa primero en roedores como ratones o ratas. En las etapas más avanzadas del desarrollo de fármacos, especialmente antes de la entrada del fármaco en seres humanos, incluso los monos deben ser incluidos en dichos estudios preclínicos.

- 20 Los mamíferos tienen normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 miligramos de anticuerpo por ml en la circulación. Típicamente, los anticuerpos monoclonales terapéuticos se tienen que probar con niveles en suero que varían desde aproximadamente 1 nanogramo por ml hasta aproximadamente 100 microgramos por ml. El anticuerpo terapéutico, por tanto, se tiene que detectar frente a un fondo de anticuerpos del animal de experimentación que están en un exceso de aproximadamente 100 veces a 10 millones de veces.

- 25 La detección de un anticuerpo terapéutico humano o humanizado en el fondo de anticuerpos de un animal de experimentación representa una tarea bastante importante para el farmacólogo. La detección de un anticuerpo humano o humanizado se hace cada vez más difícil cuanto más relacionado está el animal de ensayo con el *H. sapiens*.

- 30 En el documento WO 2008/031532 se informa de un ensayo de anticuerpos antifármaco. En el documento WO 2006/066912 se informa de la detección de un anticuerpo terapéutico en un animal de experimentación. En la patente de EE. UU. N.º 5.332.665 se informa de anticuerpos monoclonales específicos de alta afinidad.

- 35 Stubenrauch, K. et al. informan de la evaluación de un inmunoensayo para la cuantificación de anticuerpos terapéuticos específica para humanos en muestras de suero de primates no humanos (J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 1003-1008). Iborra, S., et al. informan de que la vacunación con un cóctel de ADN plasmídico que codifica las histonas nucleosómicas de *Leishmania* confiere protección contra la leishmaniosis cutánea murina (Vaccine 22 (2004) 3865-3876). Ware, CF, et al. informan de un anticuerpo monoclonal de rata específico de la cadena kappa anti-ratón, 187.1.10, y de su purificación, propiedades inmunoquímicas y utilidad como reactivo general de segundo anticuerpo (J. Immunol. Meth. 74 (1984) 93-104).

Resumen de la invención

- 40 En el presente documento se informa en primer lugar de un epítipo conformacional para anticuerpos de la clase G de inmunoglobulinas de humanos y chimpancé que no está presente en los animales de experimentación utilizados comúnmente. En segundo lugar, se informa de anticuerpos anti-IgG humana y anticuerpos anti-IgG de chimpancé sin reactividad cruzada que se unen a este epítipo. En tercer lugar, se informa de ensayos que utilizan estos anticuerpos.

- 45 En el presente documento se informa de un anticuerpo que se une a IgG (inmunoglobulina de subclase G) humana o de chimpancé y que no se une a IgG canina y de tití.

- 50 El anticuerpo no se une a IgG canina, de macaco de la India, tití, mandril y macaco de Java. El anticuerpo se une específicamente a IgG humana y de chimpancé. El valor de K_D para la unión a una IgG humana o de chimpancé es de 10^{-9} mol/l o menos, determinado por resonancia de plasmón superficial y el valor de K_D para la unión a IgG canina, de macaco de la India, tití, mandril y macaco de Java es de 10^{-6} mol/l o más. El valor de K_D para la unión a una IgG humana o de chimpancé es de 10^{-9} mol/l a 10^{-13} mol/l. El valor de K_D para la unión a IgG canina, de macaco de la India, tití, mandril y macaco de Java no se puede determinar por resonancia de plasmón superficial. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En el presente documento se informa de un anticuerpo que se une específicamente a una IgG1 (inmunoglobulina de la subclase G1) que comprende un dominio constante de cadena ligera kappa.

5 El anticuerpo se une además a una IgG2. Asimismo, el anticuerpo se une además a una IgG4. El anticuerpo no se une a una IgG3. El anticuerpo no se une a una IgG1 que comprende un dominio constante de cadena ligera lambda. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

10 Los anticuerpos informados en el presente documento obtenidos a partir de las líneas celulares DSM ACC3006 (M-1.3.2), DSM ACC3007 (M-1.5.8) y DSM ACC3008 (M-1.7.10) muestran una reactividad cruzada reducida en comparación, por ejemplo, con el anticuerpo M-R10Z8E9 producido por la línea celular DSM ACC2708, se unen a diferentes epítomos en la región Fab, no están influenciados por un sitio de glicosilación vecino y se pueden mezclar en un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos terapéuticos de Fab, ya que los sitios de unión de cada uno de los anticuerpos están presentes una sola vez en el fragmento Fab.

15 Aspectos individuales de los que se informa en el presente documento son las líneas celulares DSM ACC3006, DSM ACC3007 y DSM ACC3008, así como los respectivos anticuerpos obtenidos a partir de las líneas celulares y el uso de estos anticuerpos en un inmunoensayo.

20 En el presente documento se informa de un kit que comprende

a) un anticuerpo obtenido de la línea celular DSM ACC3006 o DSM ACC3007 o DSM ACC3008 o DSM ACC2708 en forma biotinilada,

25 b) un anticuerpo obtenido de la línea celular DSM ACC3006 o DSM ACC3007 o DSM ACC3008 o DSM ACC2708 en forma digoxigenilada,

Otro aspecto del que se informa en el presente documento es un procedimiento para detectar un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación que comprende las etapas de

30 a) proporcionar la muestra que se va a analizar,

b) incubar la muestra con un anticuerpo como se informa en el presente documento

35 c) opcionalmente, incubar la muestra con un reactivo apropiado para la detección selectiva de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno, y

d) correlacionar el complejo formado en (b) o (c) con la concentración del anticuerpo terapéutico, opcionalmente a través de una curva de calibración.

40 Otro aspecto más del que se informa en el presente documento, es un procedimiento para determinar inmunológicamente un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación usando un inmunoensayo de doble antígeno (*bridging*) que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo trazador se seleccionan independientemente de anticuerpos, como se informa en el presente documento.

50 En un modo de realización, el inmunoensayo es un inmunoensayo tipo sándwich. En otro modo de realización, la conjugación del anticuerpo con su socio de conjugación se realiza mediante unión química a través de grupos N-terminal y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólicos del esqueleto de aminoácidos del anticuerpo y/o grupos alditol de la estructura glucídica del anticuerpo. En un modo de realización adicional, el anticuerpo de captura se inmoviliza a través de una pareja de unión específica. En un modo de realización, el anticuerpo de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se realiza por medio de avidina o estreptavidina inmovilizada. En aún otro modo de realización, el anticuerpo trazador se conjuga con el marcador detectable por medio de una pareja de unión específica. En un modo de realización, el anticuerpo trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcador detectable se realiza por medio de un anticuerpo contra digoxigenina. En otro modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un Fab. En un modo de realización, el animal de experimentación se selecciona del grupo que comprende los miembros de las familias de titíes y tamarinos, monos del viejo mundo, lémures enanos y ratón, gibones y simios menores, lémures verdaderos, así como cruces de los mismos. En un modo de realización, el animal de experimentación se selecciona de perro, macaco de la India, tití, mandril y macaco de Java. En un modo de realización, el animal de experimentación es un mono *Macaca*. En un modo de realización adicional, el anticuerpo que se une al anticuerpo terapéutico y no se une a la inmunoglobulina del animal de experimentación es un anticuerpo del que se informa en el presente documento. En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. En un modo adicional 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 otro más se detecta el anticuerpo terapéutico que está unido a su antígeno.

Otro aspecto del que se informa en el presente documento es el uso de un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a la inmunoglobulina de un animal de experimentación para determinar la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno en una muestra obtenida de un animal de experimentación, en el que el anticuerpo es un anticuerpo del que se informa en el presente documento.

Un aspecto adicional del que se informa en el presente documento es una composición de anticuerpos que comprende una mezcla del anticuerpo producido por la línea celular DSM ACC3006, la línea celular DSM ACC3007, la línea celular DSM ACC3008 y/o la línea celular DSM ACC2708.

Un aspecto también es el uso de una composición de anticuerpos de los que se informa en el presente documento en un procedimiento del que se informa en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

El anticuerpo anti-IgG humana sin reactividad cruzada, denominado M-R10Z8E9 (obtenido a partir de la línea celular DSM ACC2708) se une a un epítipo en el dominio CH2 de inmunoglobulina humana de clase G cerca del sitio de glicosilación Asn297. Los anticuerpos M-1.3.2, M-1.5.8 y M-1.7.10 de los que se informan en el presente documento muestran una reactividad cruzada reducida en comparación con el anticuerpo M-R10Z8E9, se unen a un epítipo diferente en la región Fab, no están influenciados por un sitio de glicosilación vecino y se pueden mezclar en un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos terapéuticos, especialmente de anticuerpos terapéuticos de Fab, ya que los sitios de unión de cada uno de los anticuerpos están presentes en el fragmento Fab.

El término «anticuerpo terapéutico» designa un anticuerpo que se prueba en estudios clínicos para su aprobación como agente terapéutico humano y que se pueda administrar a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad. En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal. En un modo adicional de realización, el anticuerpo terapéutico se selecciona de un anticuerpo obtenido de un gran simio, un anticuerpo obtenido de un animal transformado con un locus de anticuerpo humano, un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado. En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal humano. En un modo adicional de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal humanizado. Los anticuerpos terapéuticos se utilizan ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo, neoplasias malignas hematológicas y sólidas, incluyendo linfoma no Hodgkin, cáncer de mama y cáncer colorrectal), enfermedades inmunitarias, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades vasculares o enfermedades infecciosas. Estos anticuerpos son, por ejemplo, anticuerpos contra CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Y de Levis, receptor de IL-6 (IL6R) o receptor de IGF-1 (IGF1R).

El término «anticuerpo» abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpo, incluyendo anticuerpos enteros y fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo del que se informa en el presente documento, es, en un modo de realización, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo empobrecido para antígenos de linfocitos T. La ingeniería genética de anticuerpos se describe, por ejemplo, en Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; la patente de EE. UU. N.º 5.202.238 y la patente de EE. UU. N.º 5.204.244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125.

Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias parciales derivadas de un anticuerpo no humano y de un anticuerpo humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados se derivan de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor), en el que los residuos de una región hipervariable se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad y afinidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) del anticuerpo humano se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender modificaciones adicionales, por ejemplo, residuos de aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Dichas modificaciones dan lugar a variantes de dicho anticuerpo receptor o donante, que son homólogas pero no idénticas a la secuencia original correspondiente. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo.

En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, al menos uno y típicamente dos, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de un anticuerpo donante no humano, y todas o esencialmente todas las FR son las de un anticuerpo receptor humano. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de un anticuerpo, típicamente la de un anticuerpo humano.

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de

«importación», que típicamente se toman de un dominio variable de «importación». La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo no humano. En consecuencia, dichos anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de la región marco se han sustituido por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores o primates no humanos.

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 excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes sitios antigénicos (determinantes o epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único sitio antigénico en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos, ya que se pueden sintetizar sin contaminarse con otros anticuerpos. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

El término «animal de experimentación» como se utiliza en el presente documento designa los miembros de las familias del orden de los primates que comprenden los títies y los tamarinos (familia *Callitrichidae*), los monos del nuevo mundo (familia *Cebidae*), los monos del viejo mundo (familia *Cercopithecidae*, por ejemplo, monos *Macaca*), lémures enanos y ratón (familia *Cheirogaleidae*), aye-aye (familia *Daubentoniidae*), bushbabies y galagos (familia *Galagonidae*), gibones y monos menores (familia *Hylobatidae*), indris, sifakas y parientes (familia *Indridae*), lémures verdaderos (familia *Lemuridae*), loris (familia *Loridae*), lémures deportivos (familia *Megaladapidae*), tarseros (familia *Tarsiidae*), así como los cruces de los mismos.

En un modo de realización, el animal de experimentación se selecciona del grupo que comprende los miembros de las familias de títies y tamarinos, monos del viejo mundo, lémures enanos y ratón, gibones y simios menores, lémures verdaderos, así como cruces de los mismos. En este modo de realización se excluyen los parientes más cercanos al género humano, los grandes simios, especialmente el grupo de chimpancés, bonobos, gorilas y orangutanes.

El término «muestra» designa cualquier muestra de tejido o líquido extraída de un animal de experimentación. En un modo de realización, la muestra será una muestra de líquido como saliva, orina, sangre total, plasma o suero. En un modo adicional de realización, la muestra será sangre total, plasma o suero.

Un «anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo de un animal de experimentación» se unirá a un anticuerpo terapéutico con una constante de disociación (K_{Dis}) de al menos 10^{-9} mol/l; en otro modo de realización; con una K_{Dis} de al menos 10^{-10} mol/l. Al mismo tiempo, la propiedad de no unirse al anticuerpo del animal de experimentación está garantizada por una K_{Dis} de 10^{-7} mol/l o peor. También en un modo de realización, el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo de un animal de experimentación tendrá una diferencia en K_{Dis} de al menos 100 veces entre su reactividad hacia la inmunoglobulina de clase G de un animal de experimentación y hacia la inmunoglobulina de clase G humana o de chimpancé, respectivamente.

Generalmente, el término «unión a» indica que un anticuerpo se une a su antígeno o al receptor de anticuerpo correspondiente, cualquiera que sea la intención en el contexto respectivo, con una constante de disociación ($K_D = K_{Dis}$) de 10^{-9} mol/l o menos; en otro modo de realización, con una K_D de al menos 10^{-10} mol/l. Al mismo tiempo, la propiedad de no unirse está garantizada por una K_D de 10^{-7} mol/l o más (por ejemplo, 10^{-5} mol/l). También en un modo de realización, el anticuerpo que se une a un primer anticuerpo y no se une a un segundo anticuerpo tendrá una diferencia en K_D de al menos 100 veces entre su reactividad hacia la primera inmunoglobulina de clase G y hacia la segunda inmunoglobulina de clase G.

En un modo de realización, las propiedades de unión de un anticuerpo, especialmente la K_{Dis} , se evalúan por resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore®. En el presente procedimiento, las propiedades de unión se evalúan por cambios en la resonancia de plasmón superficial (SPR). Es conveniente unir el anticuerpo en investigación a la fase sólida (denominada chip) y evaluar la unión de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o incluso de suero que comprende IgG a este chip recubierto.

El anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo del animal de experimentación en investigación puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de dicho anticuerpo. Se puede usar cualquier fragmento de anticuerpo que retenga los criterios anteriores de unión al anticuerpo terapéutico y de no unión al anticuerpo del animal de experimentación.

5 Durante los estudios preclínicos se pueden tener que evaluar diversos aspectos relacionados con la aplicación de un anticuerpo terapéutico en un animal de experimentación. En ciertos entornos puede ser pertinente analizar la cantidad total de anticuerpo terapéutico presente, o puede ser importante analizar ciertos fragmentos de un anticuerpo terapéutico, o ciertas modificaciones de un anticuerpo terapéutico, o la concentración de anticuerpo terapéutico unido a un antígeno o la fracción de un anticuerpo terapéutico todavía capaz de unirse a un antígeno. En un modo de realización, los anticuerpos y los procedimientos de los que se informa en el presente documento se pueden usar para detectar el anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno, respectivamente.

10 El término «anticuerpo terapéutico total» designa cualquier anticuerpo detectado independientemente de si el anticuerpo es activo (es decir, todavía reactivo con su antígeno), inactivo y/o unido a antígeno.

15 El término «anticuerpo terapéutico activo» designa el anticuerpo terapéutico presente en un animal de experimentación que todavía es capaz de unirse a su antígeno. Dichos anticuerpos, por ejemplo, no se han unido a su antígeno ni a ninguna otra molécula en su sitio de unión a antígeno.

El término «anticuerpo terapéutico unido a antígeno» designa el anticuerpo terapéutico presente en la circulación de un animal de experimentación que está unido a su antígeno.

20 El anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno como se ha definido anteriormente se puede detectar directamente con los anticuerpos y en los procedimientos de los que se informa en el presente documento. Adicionalmente, es posible detectar otras formas de anticuerpos terapéuticos no activos, tales como anticuerpos terapéuticos unidos por anticuerpos antifármaco o anticuerpos anti-idiotipo o especialmente anticuerpos antifármaco neutralizantes.

25 Además, también es posible evaluar indirectamente cualquier «anticuerpo terapéutico inactivo». Dicho anticuerpo terapéutico inactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico unido a su antígeno, o el anticuerpo terapéutico unido a un antígeno con reactividad cruzada, o el anticuerpo terapéutico bloqueado por un autoanticuerpo o anticuerpo anti-idiotípico contra el anticuerpo terapéutico. En el caso de que la cantidad de anticuerpo total sea mayor que la suma de anticuerpo activo y anticuerpo unido a antígeno, estará presente una fracción adicional de anticuerpo que comprende el anticuerpo inactivo no unido a su antígeno correspondiente.

30 El anticuerpo terapéutico total, por ejemplo, se puede detectar en un sistema de inmunoensayo denominado competitivo o en un sistema de ensayo denominado de tipo sándwich. Dicho ensayo se puede realizar en un modo de realización sin etapas de lavado (inmunoensayo homogéneo) o en otro modo de realización con etapas de lavado (inmunoensayo heterogéneo).

35 En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico total se detecta en un inmunoensayo tipo sándwich, en el que el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo del animal de experimentación se usa en ambos lados de dicho ensayo de tipo sándwich. El anticuerpo usado en un lado de dicho sándwich está unido o es capaz de unirse a una fase sólida (a menudo denominada anticuerpo de captura), mientras que el anticuerpo del otro lado de dicho sándwich está marcado de tal manera que se facilite la detección directa o indirecta (denominado anticuerpo de detección). La cantidad de anticuerpo de detección unida en dicho procedimiento de ensayo de tipo sándwich se correlaciona directamente con la cantidad de anticuerpo terapéutico presente en la muestra investigada.

40 La detección del anticuerpo terapéutico activo en una muestra se puede conseguir mediante procedimientos de uso generalizado en la técnica. Sin embargo, la detección del anticuerpo terapéutico total o de la fracción de anticuerpo terapéutico unido a su antígeno 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 los anticuerpos de los que se informa en el presente documento que se unen a un anticuerpo terapéutico y no se unen al anticuerpo del animal de experimentación es posible evaluar la fracción de anticuerpo terapéutico activo, anticuerpo terapéutico total o anticuerpo terapéutico unido a antígeno en sistemas de prueba que son análogos entre sí. Este tipo de evaluación comparativa de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno debe tener ventajas una vez que se hacen las comparaciones cuantitativas entre estas diversas fracciones de anticuerpo terapéutico.

45 En un modo de realización, se configura un formato de ensayo de tipo sándwich para detectar el anticuerpo terapéutico activo. En un modo adicional de realización, el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo del animal de experimentación se usa como un anticuerpo de captura y el lado de detección de dicho ensayo de tipo sándwich hace uso del antígeno en una forma marcada o después de la unión del antígeno hace uso de un segundo anticuerpo que no se une a o no compite con el epítipo reconocido por el anticuerpo terapéutico, en el que el segundo anticuerpo es específicamente detectable y/o está marcado de tal manera que facilita la detección directa o indirecta.

50 El anticuerpo terapéutico unido a antígeno en un modo de realización se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich usando el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo del animal de experimentación como reactivo de captura. En la detección en un modo de realización se utiliza un segundo

anticuerpo que se une al antígeno en un epítipo que no compite con el epítipo del anticuerpo terapéutico. En un modo de realización, el segundo anticuerpo está marcado de tal manera que facilita la detección directa o indirecta.

5 Para la detección directa, el grupo marcador se puede seleccionar de cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, tales 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 metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo, las usadas para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo donante con enzima clonada) y radioisótopos. En un modo de realización, los quelatos metálicos que se pueden detectar por electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales utilizados como marcadores detectables, dándose particular preferencia a los quelatos de rutenio. En un modo de realización, el grupo marcador es un quelato de rutenio con (bispiridilo)₃²⁺.

15 Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo el anticuerpo de detección, se marque con un primer miembro de una pareja de unión. 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, el primer miembro de la pareja de unión se selecciona de hapteno, antígeno y hormona. En un modo de realización, el hapteno se selecciona de digoxina y biotina y sus análogos. El segundo ligando de dicha pareja de unión, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., se suele marcar para permitir la detección directa, por ejemplo, mediante los marcadores que se han mencionado anteriormente.

25 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 del que se informa en el presente documento se correlaciona mediante procedimientos del estado de la técnica con la concentración correspondiente del anticuerpo terapéutico. Dicha correlación se puede realizar, por ejemplo, mediante la preparación y determinación del complejo en una serie de diluciones del complejo correspondiente con el procedimiento del que se informa en el presente documento y mediante la correlación del resultado obtenido con la concentración de los componentes individuales del complejo. Dependiendo del reactivo de detección empleado, esta etapa de correlación dará como resultado la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno.

35 Como el experto en la técnica apreciará, los procedimientos de los que se informa en el presente documento no solo revelarán las concentraciones de anticuerpo terapéutico total, unido a antígeno, activo o incluso inactivo. Debido al uso de un solo y el mismo reactivo, el anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo del animal de experimentación, los valores obtenidos en los diferentes ensayos se pueden comparar fácilmente entre sí e incluso se pueden evaluar las proporciones entre los mismos. En un modo adicional de realización, el presente procedimiento se refiere a la proporción entre el anticuerpo terapéutico activo y el total. Esta proporción también puede servir como un indicador de la eficacia de un anticuerpo terapéutico.

45 Durante el transcurso de los experimentos se ha encontrado que uno o más epítopos que están presentes en todas las clases de anticuerpos humanos y de chimpancé de la clase G no están presentes en el anticuerpo de ningún animal de experimentación. Este epítipo o epítopos se caracterizan por su unión a los anticuerpos producidos por las líneas celulares DSM ACC3006, DSM ACC3007 y DSM ACC3008 depositadas. Por lo tanto, un aspecto del que se informa en el presente documento es un anticuerpo producido por la línea celular DSM ACC3006 o DSM ACC3007 o DSM ACC3008.

50 Dado que el epítipo o los epítopos reconocidos por las tres líneas celulares depositadas son únicos en la región Fab de un anticuerpo del que se informa en el presente documento, el epítipo o los epítopos se unen a los anticuerpos obtenidos de las líneas celulares depositadas DSM ACC3006, DSM ACC3007, DSM ACC3008.

55 La especificidad de los anticuerpos obtenidos de las líneas celulares DSM ACC3006, DSM ACC3007 y DSM ACC3008 depositadas se puede mostrar en un ELISA de tipo sándwich empleando cada una una variante biotinilada y una variante digoxigenilada de los respectivos anticuerpos y suero de diferentes especies. En el ensayo (véase la figura 1), los anticuerpos de captura y de detección se obtienen a partir de la misma línea celular que se une a epítopos idénticos. Para que el ensayo para detección y cuantificación de IgG humana en el suero de un animal de experimentación sea generalmente aplicable, dicho ensayo requiere un anticuerpo anti-IgG humana cuyo sitio de unión sea independiente de cualquier modificación de anticuerpo secundaria, tal como, por ejemplo, glicosilación o desamidación. De lo contrario, sería necesario optimizar el ensayo para cada nuevo anticuerpo terapéutico que se desee detectar y cuantificar. Además, cada uno de los anticuerpos anti-IgG humana de los que se informa en el presente documento también es diferente del anticuerpo terapéutico analizado y se puede emplear como patrón de referencia y control positivo. Los resultados de especificidad obtenidos con este ensayo se muestran en la figura 2.

65 Se puede observar que los anticuerpos de los que se informa en el presente documento son altamente específicos

para inmunoglobulina humana y de chimpancé de la clase G de inmunoglobulinas y muestran una especificidad mayor que el anticuerpo M-R10Z8E9 y no se unen a la inmunoglobulina de clase G de un animal de experimentación. Todos los valores de los animales de experimentación están muy por debajo de un valor del blanco obtenido con ABTS sin peroxidasa presente.

La especificidad de los anticuerpos de los que se informa en el presente documento también se puede mostrar en un experimento de resonancia de plasmón superficial usando la tecnología BIAcore. En las figuras 3a) a c) se muestran los diagramas BIAcore de los anticuerpos M-1.7.10 (obtenidos de DSM ACC3008), M-1.3.2 (obtenidos de DSM ACC3006) y M-1.5.8 (obtenidos de DSM ACC3007) a partir de los cuales se puede ver que los anticuerpos son específicos para inmunoglobulina humana y de chimpancé de la clase G.

Mediante el uso de experimentos dot-blot, se ha demostrado que el epítipo o epítipos unidos por los anticuerpos de los que se informa en el presente documento son un epítipo conformacional, ya que la unión se pierde la inmunoglobulina humana desnaturalizada (Figura 4).

Otro aspecto del que se informa en el presente documento es un ensayo para cuantificar un anticuerpo humano o su derivado tal como fragmentos Fab en una muestra obtenida de un animal de experimentación que comprende un anticuerpo biotinilado del que se informa en el presente documento como anticuerpo de captura y un anticuerpo digoxigenilado del que se informa en el presente documento como anticuerpo trazador. En la figura 5 se muestra la configuración esquemática del ensayo y una curva de calibración para este ensayo con anticuerpos ejemplares de los que se informa en el presente documento (anticuerpo de captura: M-1.7.10 biotinilado, analito: fragmento Fab de anticuerpo anti-IL13R α 1 humano, anticuerpo trazador: M-1.3.2 digoxigenilado). Este ensayo requiere anticuerpos de captura y trazador que se unan al fragmento Fab de IgG humana en dos epítipos diferentes. Los anticuerpos de los que se informa en el presente documento se unen al menos parcialmente al dominio de la cadena ligera constante de un anticuerpo humano o de chimpancé de la clase G de inmunoglobulina y, por lo tanto, son muy adecuados para este ensayo.

En el presente documento se informa de un ensayo que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador que se unen específicamente a epítipos en diferentes dominios de una IgG humana. En este ensayo solo un anticuerpo terapéutico intacto dará lugar a un resultado de ensayo positivo y una señal detectable. El anticuerpo de captura y el anticuerpo trazador se seleccionan independientemente de los anticuerpos de los que se informa en el presente documento por una parte y el anticuerpo M-R10Z8E9 por otra parte. En un ensayo ejemplar para demostrar la integridad estructural de una IgG humana en un animal de experimentación, se emplea M-R10Z8E9 biotinilado como anticuerpo de captura, un anticuerpo anti-IL13R α 1 como analito y M-1.3.2 digoxigenilado como anticuerpo trazador (en la figura 6 se muestra la configuración esquemática del ensayo y una curva de calibración para este ensayo).

En el presente documento se informa de un ensayo en el que el anticuerpo anti-IgG humana se utiliza como patrón de referencia y/o control positivo para imitar un anticuerpo antifármaco (AAF). Esto puede ser útil durante el desarrollo del ensayo para averiguar las condiciones de ensayo óptimas y la robustez analítica del ensayo, es decir, para comprobar el rendimiento del ensayo con diferentes reactivos patrón/controles positivos. Esta configuración es especialmente ventajosa en vista del hecho de que un AAF será policlonal y probablemente estará dirigido tanto contra el fragmento Fab como contra la parte Fc.

En un aspecto adicional del que se informa en el presente documento, uno de los anticuerpos obtenidos de las líneas celulares DSM ACC3006, DSM ACC3007 y DSM ACC3008 se utiliza como anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo del animal de experimentación en un procedimiento del que se informa en el presente documento.

Un aspecto adicional del que se informa en el presente documento se refiere al uso de un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une al anticuerpo de un animal de experimentación para medir la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno en una muestra obtenida de un animal de experimentación. En un modo de realización, el anticuerpo usado en dicho procedimiento se selecciona de los anticuerpos obtenidos de las líneas celulares DSM ACC3006, DSM ACC3007 o DSM ACC3008.

Un aspecto adicional del que se informa en el presente documento se refiere al uso de dos anticuerpos que se unen ambos a un anticuerpo terapéutico y no se unen al anticuerpo de un animal de experimentación para medir la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno en una muestra obtenida de un animal de experimentación, en el que uno de los anticuerpos es el anticuerpo de captura y uno de los anticuerpos es el anticuerpo trazador. En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un fragmento Fab.

De forma alternativa, los anticuerpos de los que se informa en el presente documento, se pueden usar en un conjugado que comprende como una parte una inmunoglobulina de referencia de una única clase de inmunoglobulina. La inmunoglobulina de referencia proporciona una región constante específica de una clase de inmunoglobulina que se puede unir específicamente por un anticuerpo anti-inmunoglobulina de clase, tal como un anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana. De este modo, la inmunoglobulina de referencia proporciona dicho

conjugado con una etiqueta específica de clase de inmunoglobulina, que se puede identificar específicamente mediante un anticuerpo específico de etiqueta. Por ejemplo, si la etiqueta es una región constante de inmunoglobulina G, un anticuerpo específico de la etiqueta es un anticuerpo anti-inmunoglobulina G. Dicho conjugado se puede usar como patrón en un inmunoensayo o como control positivo en un inmunoensayo.

En los procedimientos de los que se informa en el presente documento también se pueden usar diferentes moléculas de captura tales como anticuerpos completos, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab o incluso anticuerpos de cadena única.

Las líneas celulares de hibridoma preferentes de las que se informa en el presente documento son MAK<H-IgG>M-1.3.2, MAK<H-IgG>M-1.5.8, MAK<H-IgG> M-1.7.10, que expresan los anticuerpos M-1.3.2, M-1.5.8 y M-1.7.10, respectivamente, y se depositaron, según el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines de procedimiento en materia de patentes, en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania:

Línea celular	N.º de depósito	Fecha de depósito
MAB<h-Fc gamma>M-R10Z8E9	DSM ACC2708	22/12/2004
MAK<H-IgG>M-1.3.2	DSM ACC3006	24/09/2009
MAK<H-IgG>M-1.5.8	DSM ACC3007	24/09/2009
MAK<H-IgG>M-1.7.10	DSM ACC3008	24/09/2009

Las líneas celulares y los anticuerpos obtenibles a partir de dichas líneas celulares son aspectos de los que se informa en el presente documento.

Los procedimientos de los que se informa en el presente documento se ejemplifican con un anticuerpo contra la proteína del receptor $\alpha 1$ de IL13 (anticuerpo anti-IL13R $\alpha 1$) del que se informa en el documento WO 2006/072564, un anticuerpo contra el receptor de IL-1R (anticuerpo anti-IL1R) del que se informa en el documento WO 2005/023872, un anticuerpo contra el péptido amiloide β -A4 (anticuerpo anti-A β) del que se informa en el documento WO 2003/070760 o la patente de EE. UU. US 2005/0169925, un anticuerpo contra la glicoproteína selectina P humana (anticuerpo anti-selectina P) del que se informe en el documento WO 2005/100402 o la patente de EE. UU. US 2005/0226876, un anticuerpo contra el receptor de IL-6 (anticuerpo anti-IL6R) del que se informa en el documento WO 2004/096274 y un anticuerpo contra el receptor de IGF-1 (anticuerpo anti-IGF1R) del que se informa en el documento WO 2004/087756 o en el documento WO 2005/005635.

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

Descripción de las figuras

Figura 1 Ensayo genéricamente completo para la cuantificación de anticuerpos humanos (IgG humana) en un animal de experimentación: a) formato del ensayo; b) reactivo de captura y de detección: anticuerpo M-R10Z8E9; c) reactivo de captura y de detección: anticuerpo M-1.7.10; anticuerpos terapéuticos: anti-IL13R $\alpha 1$ (triángulos vacíos), anticuerpo anti-Abeta (cuadrados vacíos), anticuerpo anti-IL1R (cuadrados sólidos), anticuerpo anti-IL6R (triángulos sólidos).

Figura 2 Resultados obtenidos con un ensayo que emplea los anticuerpos de los que se informa en el presente documento; anticuerpos usados (de izquierda a derecha): M-R10Z8E9, M-1.3.2, M-1.5.8, M-1.7.10.

Figura 3 Ejemplos de diagramas de resonancia de superficie de plasmón superficial de anticuerpos a) M-1.3.2, b) M-1.5.8, y c) M-1.7.10 de los que se informa en el presente documento.

Figura 4 Dot-blot de anticuerpos anti-IgG humana; como anticuerpo de referencia ejemplar se ha elegido un anticuerpo contra selectina P; el anticuerpo de referencia se siembra en forma nativa (columna izquierda) y desnaturalizada (columna derecha) en una membrana de nitrocelulosa y se detecta por los respectivos anticuerpos anti-IgG humana digoxigenilados; a) M-R10Z8E9, b) M-1.3.2, c) M-1.5.8, d) M-1.7.10.

Figura 5 Ensayo para cuantificar derivados de anticuerpos humanos en una muestra obtenida de un animal de experimentación: a) configuración esquemática del ensayo, b) curva de calibración.

Figura 6 Ensayo para demostrar la integridad estructural de la IgG humana en un animal de experimentación: a) configuración esquemática del ensayo, b) curva de calibración.

Figura 7 Selección de anticuerpos sin reactividad cruzada detectable con suero de macaco de Java.

Ejemplo 1

Preparación del fragmento F(ab')₂ de IgG humana (Immunogen)

5 El anticuerpo humano de longitud completa de la clase G (IgG humana) en tampón citrato de sodio 100 mM, pH 3,7, se incubó con pepsina (1 µg de pepsina por mg de IgG). La fragmentación se analizó por filtración analítica en gel y se detuvo después de 90 minutos ajustando el valor de pH a 6,5 mediante la adición de fosfato de potasio. Después de la diálisis de la mezcla contra tampón citrato de sodio 10 mM con cloruro de sodio 10 mM, pH 5,5, la solución se introdujo en una columna de cromatografía de SP-sepharose y las fracciones aisladas eluidas en un gradiente de sal se analizaron individualmente por filtración analítica en gel. La mezcla que contenía los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo se aplicó a una matriz de afinidad con anticuerpos policlonales inmovilizados contra Fc_γ humano para eliminar las trazas de fragmentos Fc_γ. El flujo directo se combinó, se concentró hasta aproximadamente 16 mg/ml y finalmente se introdujo en una columna de filtración en gel (Superdex 200).

Ejemplo 2

15 Generación de anticuerpos monoclonales anti-IgG humana

a) Inmunización de ratones

20 Se inmunizaron ratones NMRI hembra, de 8-12 semanas de edad, esencialmente intraperitonealmente con 100 µg de los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo preparados de acuerdo con el ejemplo 1 mezclados con CFA (adyuvante completo de Freund). Se realizaron otras dos etapas de inmunización intraperitoneal después de 6 y 10 semanas, cada una con 100 µg de los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo por ratón mezclados con IFA (adyuvante incompleto de Freund). Posteriormente, se realizaron inmunizaciones intravenosas de refuerzo, cada una con 50 µg de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo en PBS (solución salina tamponada con fosfato) tres días antes de la fusión.

b) Fusión y clonación

30 Se fusionaron células de bazo de los ratones inmunizados según a) con células de mieloma de acuerdo con Galfré y Milstein (Galfré, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46). Se mezclaron aproximadamente $2,1 \times 10^8$ esplenocitos con $4,2 \times 10^7$ células de mieloma (P3x63-Ag8.653, ATCC CRL1580) y se centrifugaron (10 minutos a $300 \times g$ y 4 °C). Las células se lavaron después una vez con el medio de cultivo RPMI 1640 sin FCS (suero de ternera fetal) y se centrifugaron de nuevo a $400 \times g$ en un vial cónico de 50 ml. A continuación, se añadió 1 ml de PEG (poli(etilenglicol), peso molecular de 4000 g/mol) y la mezcla se realizó mediante pipeteado. Después de 1 minuto en un baño de agua a 37 °C, se añadieron gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin FCS, se mezcló la suspensión, se añadió RPMI 1640 con FCS a un 10 % (v/v) hasta un volumen final de 50 ml y luego se centrifugó. Las células sedimentadas se resuspendieron en RPMI 1640 con FCS a un 10 % y se sembraron en medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina en RPMI 1640 con FCS a un 10 %) que contenía el factor de crecimiento interleucina 6 murina recombinante (Peprotech, 0,5 ng/ml). Después de 40 11 días, los cultivos primarios se sometieron a prueba para la síntesis específica de anticuerpos (véase el ejemplo 3). Los cultivos primarios que mostraban unión a fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo biotinilado, así como a IgG humana normal biotinilada, se individualizaron mediante depósito de células individuales en placas de cultivo celular de 96 pocillos usando un citómetro de flujo (FACSAria, BD Biosciences) en un medio que contenía el factor de crecimiento interleucina 6 murina recombinante (Peprotech, 0,5 ng/ml). Siguiendo este protocolo, se obtuvieron 45 las líneas celulares DSM ACC3006, DSM ACC3007 y DSM ACC3008. El anticuerpo M-1.7.10 es de la clase IgG2a, los anticuerpos M-1.5.8 y M-1.3.2 son de la clase IgG1.

c) Producción de inmunoglobulina

50 Las líneas celulares de hibridoma obtenidas en b) se inocularon a densidades celulares iniciales (células vivas) entre $1,0 \times 10^5$ y $2,2 \times 10^5$ células por ml en RPMI 1640 suplementado con FCS a un 10 %, y los suplementos de uso común y se expandieron en un frasco de cultivo (Celline, IBS) durante un periodo de aproximadamente tres semanas. En los sobrenadantes del cultivo cosechado se obtuvieron concentraciones entre 0,7 mg/ml y 1,5 mg/ml de anticuerpo monoclonal. La purificación de los anticuerpos de los sobrenadantes de cultivo se realizó de acuerdo con procedimientos químicos estándar de proteínas, por ejemplo, como de los que se informa en Bruck, C., et al., Methods Enzymol. 121 (1986) 587-596.

Ejemplo 3

60 Ensayos de cribado para la detección de anticuerpos anti-IgG humana

a) Cribado primario de anticuerpos que se unen a IgG humana

65 Para la determinación de la especificidad de los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma, MTPs (placas de microtitulación) previamente recubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat, Bernried, lote MC 1098) se recubrieron con IgG humanizada biotinilada utilizada para el proceso de inmunización,

250 ng/ml, o IgG humana biotinilada, 250 ng/ml, respectivamente, en PBS suplementado con BSA II a un 1 % (p/v) (100 µl por pocillo, 60 min de incubación a temperatura ambiente, con agitación), y posteriormente se lavaron tres veces con NaCl a un 0,9 % (p/v) / Tween® 20 a un 0,05 %. En la siguiente etapa, se añadieron 100 µl de la solución de anticuerpo que se iba a someter a prueba (sobrenadante de cultivo) por pocillo y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación. Después de tres etapas de lavado con NaCl a un 0,9 % (p/v) / Tween® 20 a un 0,05 % por pocillo, se añadieron 100 µl de un fragmento F(ab')₂ marcado con peroxidasa de rábano picante de un anticuerpo policlonal de oveja anti-Fc_γ de ratón para la detección del anticuerpo de la muestra unido, y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente, se realizó el lavado como anteriormente. Finalmente, se añadieron 100 µl de ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, ref. 1684302) por pocillo. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la extinción (OD) a 405 y 492 nm [405/492] en un lector ELISA de placas de microtitulación comercial. Este cribado dio lugar a una selección de anticuerpos que se unen bien a IgG humanizada, así como a IgG humana. Esta selección de anticuerpos se sometió adicionalmente al ensayo b).

b) Selección de anticuerpos con mínima reactividad cruzada con IgG de otras especies

La IgG humana biotinilada se unió a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Posteriormente, las muestras y los patrones de referencia (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humana como se obtiene en el ejemplo 2) se diluyeron en tampón y suero de macaco de Java a un 10 %. Se añadieron muestras diluidas a la placa y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación. Después de haber eliminado las sustancias no unidas mediante lavado, la IgG humana de la primera etapa en forma digoxigenilada se añadió a los pocillos de la placa y se incubó durante otros 60 min. Después del lavado, el anticuerpo digoxigenilado unido se detectó con un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y HRP. La HRP (peroxidasa de rábano picante) de los conjugados anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS. La señal se mide con un lector ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

Se seleccionaron anticuerpos con alta respuesta de ensayo en suero de macaco de Java, así como en tampón (véase la figura 7). Este segundo cribado dio lugar a una selección de anticuerpos que se unen bien a IgG humana con mínima reactividad cruzada con IgG de otras especies.

Ejemplo 4

Evaluación de la unión a anticuerpos / especificidad por resonancia de plasmón superficial

Todas las mediciones se realizaron con el instrumento BIAcore® T100 utilizando un chip CM5. El recubrimiento de este chip con un anticuerpo se consiguió mediante acoplamiento de amina estándar. A menos que se indique de otro modo, todas las incubaciones se realizaron en tampón HBS (HEPES, NaCl, pH 7,4) a 25 °C. Se inmovilizó una cantidad saturante de un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc-gamma de ratón mediante acoplamiento de amina en una celda de flujo del chip CM5. Posteriormente, los diferentes anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra IgG humana se inyectaron durante 60 segundos a un caudal de 30 µl/min y se unieron por el anticuerpo anti-Fc de ratón. Todos los sueros animales se diluyeron en tampón HBS. La unión se analizó mediante inyección de los sueros diluidos de 1 en 100 veces y la incubación durante 60 segundos a un caudal de 30 µl/min. La disociación se midió lavando la superficie del chip con tampón HBS durante 180 segundos. Utilizando el software BIAevaluation de BIAcore® se calcularon los valores de la constante de disociación (K_D) con un modelo de ajuste de Langmuir 1:1. Para todos los sueros animales, este cálculo se basó en el supuesto de que el nivel de IgG es de 15 mg/ml. Los valores de señal 80 segundos después de iniciar la inyección del anticuerpo experimental se eligieron para la comparación de la cantidad de IgG unida (véase la tabla 1).

Tabla 1: Señales de unión [RU] y valores de K_D para la unión de sueros animales a diferentes anticuerpos monoclonales anti-IgG humana.

Anticuerpo (→) Muestra (↓) (suero)	M-R10Z8E9		M-1.3.2	
	RU de unión	K _D mol/l	RU de unión	K _D mol/l
Chimpancé	159	2,21 × 10 ⁻¹⁰	95,7	1,12 × 10 ⁻⁹
Humano	151,3	1,77 × 10 ⁻¹⁰	80,1	1,43 × 10 ⁻⁹
Perro	35,5	3,17 × 10 ⁻⁸	-1,9	no unión
Macaco de la India	-1,9	no unión	-2,3	no unión
Tití	18,9	2,04 × 10 ⁻⁷	-2	no unión
Mandrill	-1,5	no unión	-2,2	no unión
Macaco de Java	-1,4	no unión	-2	no unión
Anticuerpo (→) Muestra (↓) (suero)	M-1.5.8		M-1.7.10	

	RU de unión	K_D mol/l	RU de unión	K_D mol/l
Chimpancé	109,4	$1,29 \times 10^{-9}$	109,4	$1,94 \times 10^{-9}$
Humano	77	$1,43 \times 10^{-9}$	77	$7,55 \times 10^{-9}$
Perro	-2,4	no unión	-2,4	no unión
Macaco de la India	-2,7	no unión	-2,7	no unión
Tití	-2,1	no unión	-2,1	no unión
Mandrill	-2,1	no unión	-2,1	no unión
Macaco de Java	-2,1	no unión	-2,1	no unión

La tabla 1 muestra que los tres anticuerpos anti-IgG humana no reaccionan de forma cruzada con el suero de otras especies, excepto chimpancé. Por el contrario, en el caso de M-R10Z8E9 se detectó una interacción adicional con suero de perro y de tití.

5 **Ejemplo 5**

a) Purificación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG humana

El sobrenadante de fermentación de las líneas celulares obtenido en el ejemplo 2 se concentró aproximadamente diez veces y se transfirió a un tampón con TRIS 20 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 9,0, y se introdujo en una columna de cromatografía de proteína A-Sepharose. El eluido obtenido con citrato de sodio 0,2 M, sulfato de amonio 0,2 M a pH 5,0 se dializó frente a tampón fosfato, pH 7,5. Los contaminantes de IgG bovina (de FCS en el caldo de fermentación) se separaron por inmunoadsorción con anticuerpos inmovilizados contra IgG bovina.

b) Preparación de anticuerpo anti-IgG humana biotinilado

El anticuerpo anti-IgG humana obtenido en a) en tampón fosfato, pH 8,5, se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 5 mg/ml. Se disolvió ácido D-biotinoil-aminocaproico-N-hidroxisuccinimida en DMSO y se le añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5. La reacción se detuvo después de 60 min mediante adición de L-lisina, y el exceso del reactivo de marcado se eliminó por diálisis frente a tampón de fosfato de potasio 50 mM, con NaCl 150 mM, pH 7,5.

c) Preparación de anticuerpo anti-IgG humana digoxigenilado

El anticuerpo anti-IgG humana obtenido en a) en tampón fosfato, pH 8,5, se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 5 mg/ml. Se disolvió ácido digoxigenina 3-O-metilcarbonil- ϵ -aminocaproico-N-hidroxisuccinimida en DMSO y se le añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:4. La reacción se detuvo después de 60 min mediante adición de L-lisina, y el exceso del reactivo de marcado se eliminó por diálisis frente a tampón de fosfato de potasio 50 mM, con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Ejemplo 6

Ensayo completamente genérico para la cuantificación de anticuerpos humanos (IgG humana) en una muestra de un animal de experimentación

El anticuerpo biotinilado M-R10Z8E9 (placa 1) o anticuerpo M-1.7.10 (placa 2) se unió a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Se añadieron problemas/patrones, por ejemplo, anticuerpo anti-ILIR, anticuerpo anti-IL13R α 1, anticuerpo anti-Abeta y anticuerpo anti-IL6R, cebados en suero de macaco de Java en una serie de concentraciones a la placa y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación. Después de haber lavado los anticuerpos no unidos, se añadieron 100 μ l de anticuerpo digoxigenilado M-R10Z8E9 (placa 1) o anticuerpo M-1.7.10 (placa 2) a la placa. Después del lavado, los anticuerpos digoxigenilados unidos se detectaron con un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y HRP. Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado (véase la figura 1).

Tabla 2: Datos de OD para el anticuerpo de reactivo de captura y detección M-R10Z8E9.

ng/ml	Anticuerpo anti-IL13R α 1	Anticuerpo anti-Abeta	Anticuerpo anti-IL1R	Anticuerpo anti-IL6R
0,00	0,022	0,023	0,024	0,024
1,56	0,119	0,139	0,085	0,105
3,13	0,226	0,264	0,153	0,190
6,25	0,408	0,482	0,276	0,348
12,50	0,772	0,881	0,546	0,664

25,00	1,229	1,310	0,980	1,084
50,00	1,672	1,707	1,521	1,565
100,00	1,967	1,927	1,877	1,819

Tabla 3: Datos OD para el anticuerpo de reactivo de captura y detección M-1.7.10.

ng/ml	Anticuerpo anti-IL13R α 1	Anticuerpo anti-Abeta	Anticuerpo anti-IL1R	Anticuerpo anti-IL6R
0,00	0,038	0,036	0,035	0,037
1,56	0,178	0,149	0,187	0,181
3,13	0,325	0,264	0,326	0,312
6,25	0,570	0,472	0,568	0,540
12,50	1,004	0,853	1,013	0,955
25,00	1,592	1,407	1,588	1,498
50,00	1,995	1,923	2,013	1,947
100,00	2,197	2,213	2,209	2,185

Ejemplo 7

Ensayo para la cuantificación de derivados de anticuerpos humanos (por ejemplo, fragmentos de Fab) en una muestra de un animal de experimentación

El anticuerpo biotilado M-1.7.10 se unió a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Se añadieron problemas/patrones, por ejemplo, fragmento Fab de anticuerpo anti-IGFIR, cebados en suero de macacos de Java, a los pocillos y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación. Después de haber eliminado los anticuerpos no unidos mediante lavado, se añadieron 100 μ l de anticuerpo digoxigenilado M-1.3.2 a cada pocillo de la placa. Después del lavado, los anticuerpos digoxigenilados unidos se detectaron con un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y HRP. Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado (véase la figura 5).

Tabla 4: Datos de OD.

ng/ml	OD 405 nm	DE
0,00	0,042	0,000
1,56	0,047	0,000
3,13	0,057	0,002
6,25	0,103	0,001
12,50	0,247	0,016
25,00	0,694	0,007
50,00	1,535	0,043
100,00	1,882	0,013

Ejemplo 8

Ensayo para demostrar la integridad estructural de IgG humana en una muestra de un animal de experimentación

El anticuerpo biotilado M-R10Z8E9 dirigido contra Fc humano se unió a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. Se añadieron problemas/patrones, por ejemplo, anticuerpo anti-IL13R α 1, cebados en suero de macaco de Java, a la placa y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación. Después de haber eliminado los anticuerpos no unidos mediante lavado, se añadieron 100 μ l de anticuerpo digoxigenilado M-1.3.2 a la placa. Después del lavado, los anticuerpos digoxigenilados unidos se detectaron con un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y HRP. Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado (véase la figura 3).

Tabla 5: Datos de OD.

ng/ml	OD 405 nm	DE
0,00	0,023	0,018
0,78	0,094	0,008
1,56	0,172	0,007

3,13	0,304	0,011
6,25	0,588	0,015
12,50	1,051	0,007
25,00	1,604	0,004
50,00	2,019	0,001

Ejemplo 9

Ensayo para la cuantificación de anticuerpos humanos (IgG humana) en una muestra de un animal de experimentación utilizando una proteína de fusión Fc (antígeno) en combinación con anticuerpos anti-IgG humana de los que se informa en el presente documento

Se fusiona el dominio extracelular soluble de un receptor humano X con el fragmento Fc de la clase IgG1 humana. La proteína de fusión biotinilada (Bi-X-Fc) se unió a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El exceso de receptor no unido se eliminó mediante lavado. Después, el anticuerpo anti-X cebado en suero de macaco de Javase unió al receptor humano X inmovilizado. Después de haber eliminado las sustancias no unidas mediante lavado, el anticuerpo anti-X unido se detectó con a) anticuerpo monoclonal digoxigenilado contra el fragmento Fc humano (anticuerpo M-R10Z8E9) o con b) anticuerpo monoclonal digoxigenilado contra fragmento Fab humano (anticuerpo M-1.7.10), seguido de incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

Ejemplo 10

Dot-blot: epítipo conformacional frente a lineal

Para determinar si los anticuerpos anti-IgG humanas detectan un epítipo conformacional o un epítipo lineal, se realizó un análisis dot-blot (transferencia de puntos).

Durante esta prueba, el antígeno-proteína (IgG humana) se sembró en una membrana de nitrocelulosa en una forma nativa y una forma desnaturalizada. Para recibir la forma desnaturalizada, el antígeno-proteína se incubó con SDS en un agitador a 37 °C durante la noche. Ambas formas se sembraron en la membrana en una serie de concentraciones. Después del secado completo de la membrana, la superficie se bloqueó con un tampón de bloqueo (Roti-Block, Roth, Alemania) durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después del lavado de la membrana, se incubó con una solución que contenía anticuerpo digoxigenilado M-R10Z8E9 o uno de los tres anticuerpos diferentes M-1.3.2, M-1.5.8 o M-1.7.10. Después del lavado, los anticuerpos digoxigenilados unidos se detectaron con un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina y HRP. La HRP de los conjugados anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato BM-Blue. La señal se puede controlar directamente de forma visual y capturar con un escáner.

Ejemplo 11

Evaluación de la unión a anticuerpos/especificidad mediante un ensayo ELISA de doble antígeno (*bridging*)

Para determinar qué subclase de IgG humana se une por los anticuerpos anti-IgG investigados, se realizó un análisis ELISA de doble antígeno.

Los anticuerpos biotinilados M-R10Z8E9, M-1.3.2, M-1.5.8 y M-1.7.10 se unieron a la placa de microtitulación de estreptavidina en la primera etapa. En una segunda etapa, se incubaron anticuerpos anti-IgG humana de diferentes subclases. Se prepararon IgG1 kappa humana; IgG1 lambda humana; IgG4 humana; IgG1 quimérica humana; IgG2 humana (IgG2 humana policlonal purificada) e IgG3 humana (IgG3 humana policlonal purificada) en una serie de diluciones y se incubaron en la placa de microtitulación de estreptavidina, recubiertas con anticuerpo anti-humano biotinilado. Después de una etapa de lavado, los mismos anticuerpos utilizados para el recubrimiento se usaron como anticuerpos de detección en forma digoxigenilada. Esto significa que el mismo clon de anticuerpo anti-humano se utilizó para recubrimiento y detección. Por ejemplo, se recubrió una placa con M-1.7.10-Bi y se usó M-1.7.10-Dig para la detección. Después de la incubación y una etapa de lavado, esta etapa fue seguida por incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. Los valores de absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

Tabla 6: Resumen de los análisis ELISA de doble antígeno

	Anticuerpo usado para recubrimiento/detección			
	mAb M-R10Z8E9	mAb M-1.3.2	mAb M-1.5.8	mAb M-1.7.10
Muestra				

ES 2 628 839 T3

IgG 1-kappa	++	++	++	++
IgG 1-lambda	++	--	--	--
IgG4	++	+	+	++
IgG1 quimérica	++	+	+	++
IgG2	+	+-	+-	++
IgG3	+-	--	--	--
Fab de IgG1-kappa	--	++	++	++
Fab de IgG1-lambda	--	--	--	--

++	unión fuerte
+	unión
+-	unión débil
--	no unión

REIVINDICACIONES

1. Línea celular DSM ACC3006 o DSM ACC3007 o DSM ACC3008.
- 5 2. Anticuerpo obtenido de una de las líneas celulares de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 en un inmunoensayo.
- 10 4. Procedimiento para detectar un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación que comprende las etapas de
 - a) proporcionar la muestra que se va a analizar,
 - 15 b) incubar dicha muestra con un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2,
 - c) opcionalmente, incubar dicha muestra con un reactivo apropiado para la detección selectiva de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno, y
 - 20 d) correlacionar el complejo formado en (b) o (c) con la concentración del anticuerpo terapéutico.
- 5 5. Procedimiento para determinar inmunológicamente un anticuerpo terapéutico en una muestra obtenida de un animal de experimentación usando un inmunoensayo de doble antígeno (*bridging*) que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo trazador, caracterizado por que dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo trazador se seleccionan independientemente de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 2.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizado por que dicho anticuerpo terapéutico es un Fab.
- 30 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por que dicho animal de experimentación se selecciona del grupo que comprende los miembros de las familias de titíes y tamarinos, monos del viejo mundo, lémures enanos y ratón, gibones y simios menores, lémures verdaderos, así como cruces de los mismos.
- 35 8. Uso de un anticuerpo que se une a un anticuerpo terapéutico y no se une a la inmunoglobulina de un animal de experimentación para medir la concentración de anticuerpo terapéutico total, activo o unido a antígeno en una muestra obtenida de un animal de experimentación, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2.
- 40 9. Composición de anticuerpo, caracterizada por que comprende una mezcla de anticuerpos producidos por la línea celular DSM ACC3006, la línea celular DSM ACC3007, la línea celular DSM ACC3008.
10. Uso de una composición de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9 en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

Fig. 1

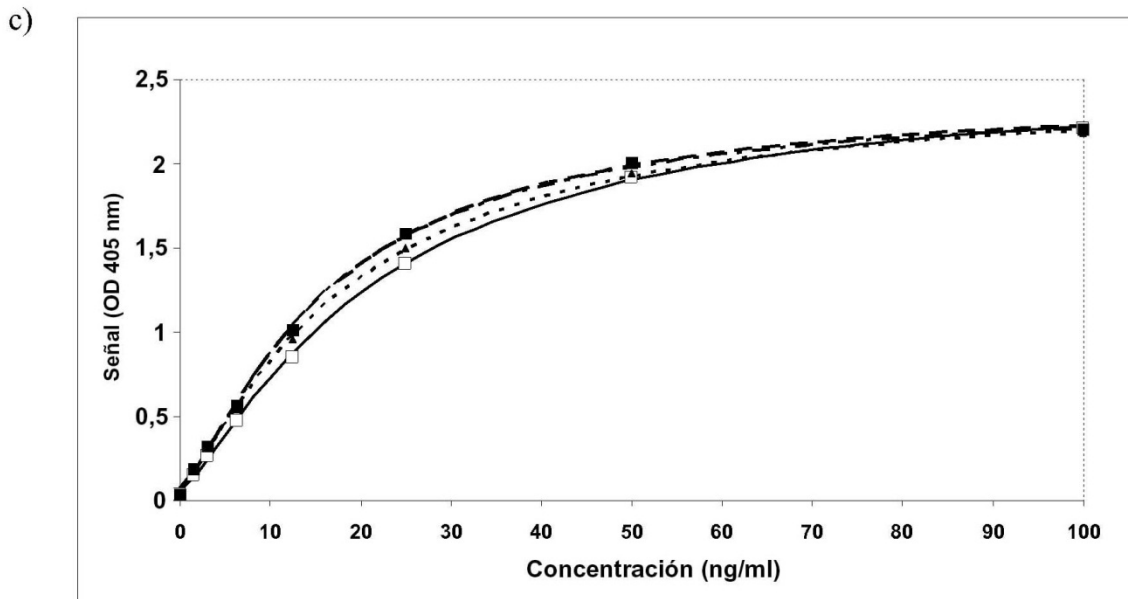
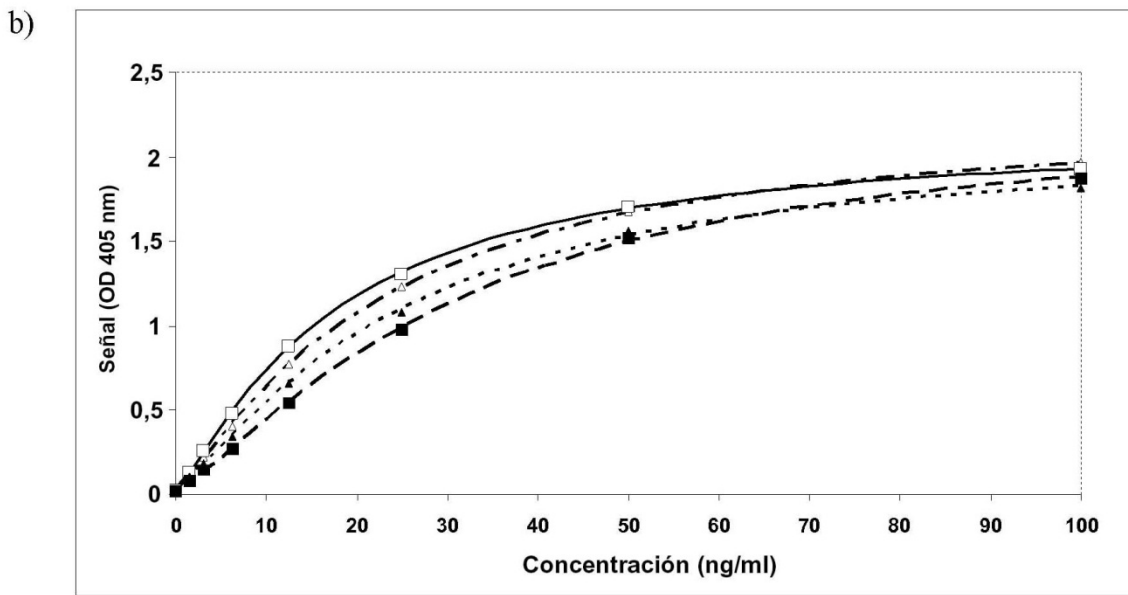
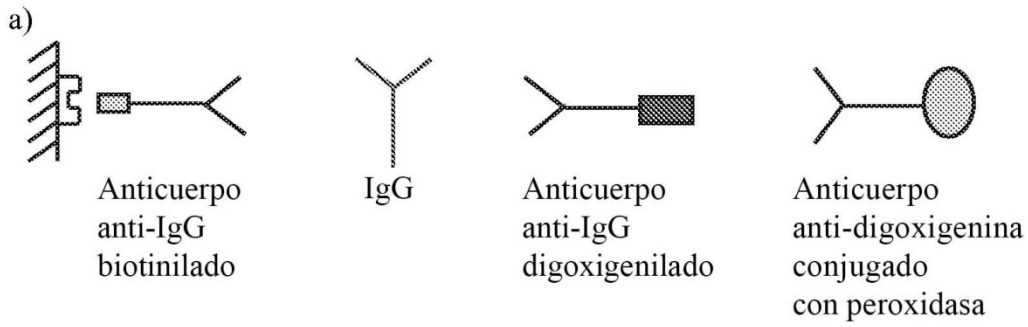


Fig. 2

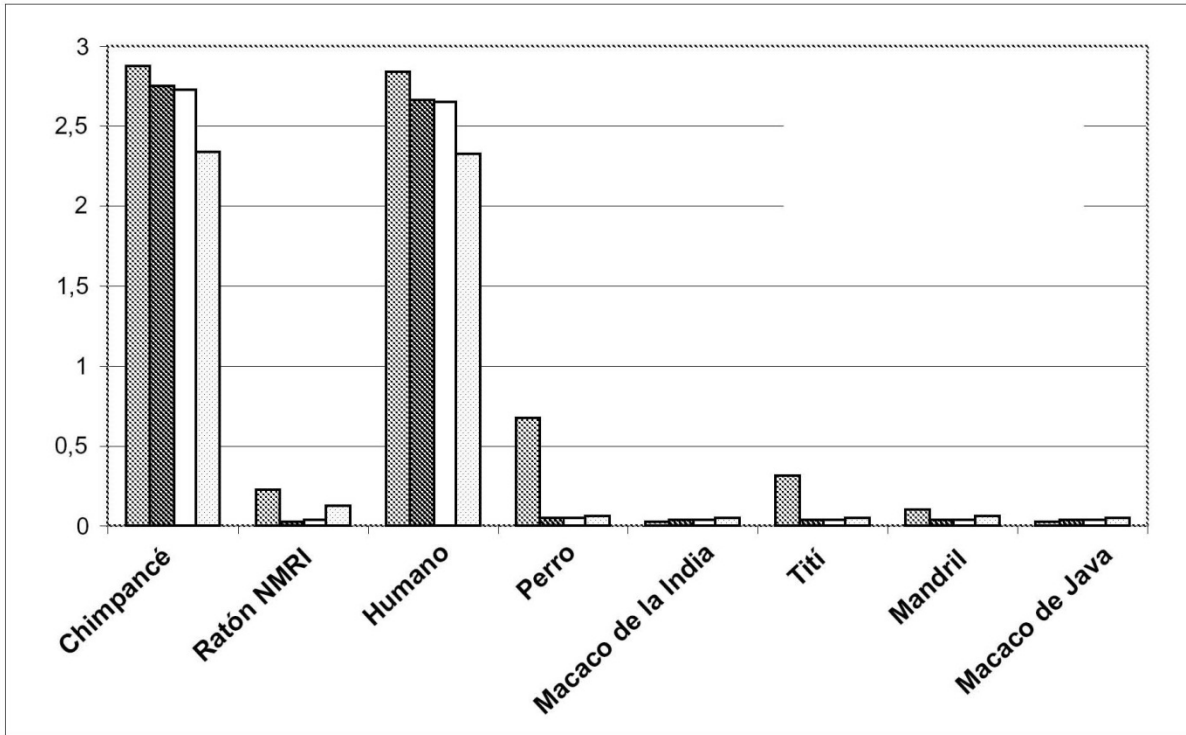
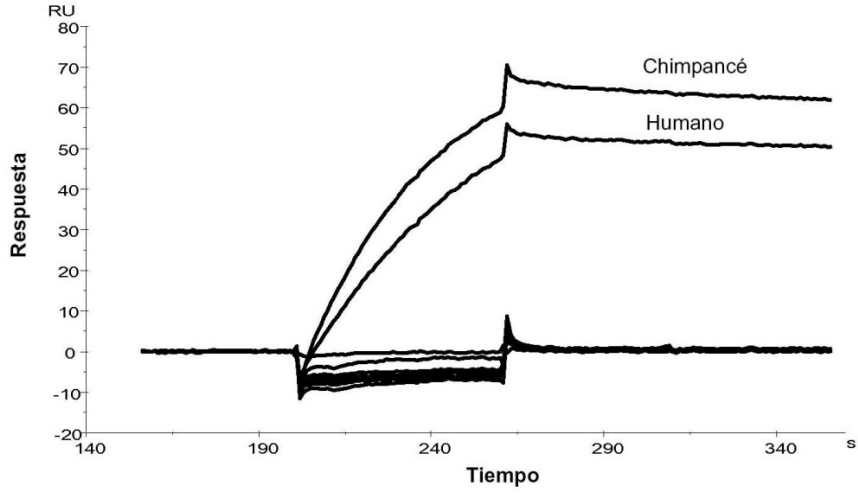
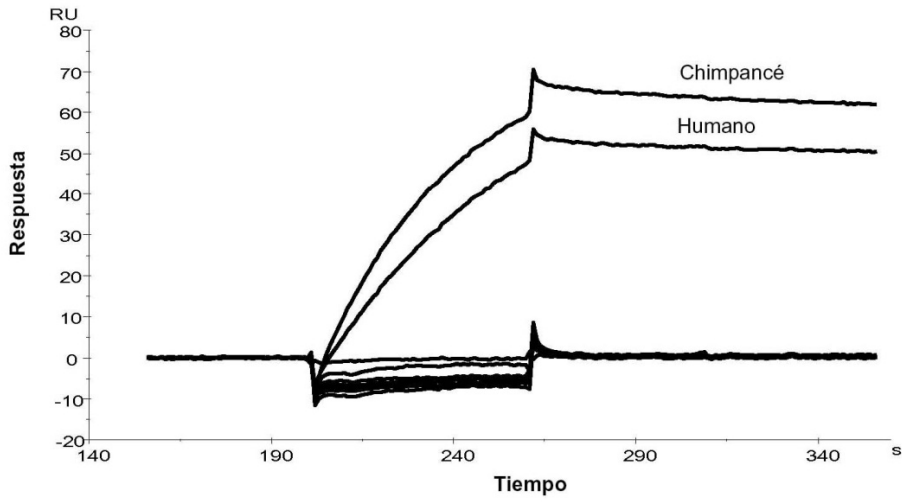


Fig. 3

a)



b)



c)

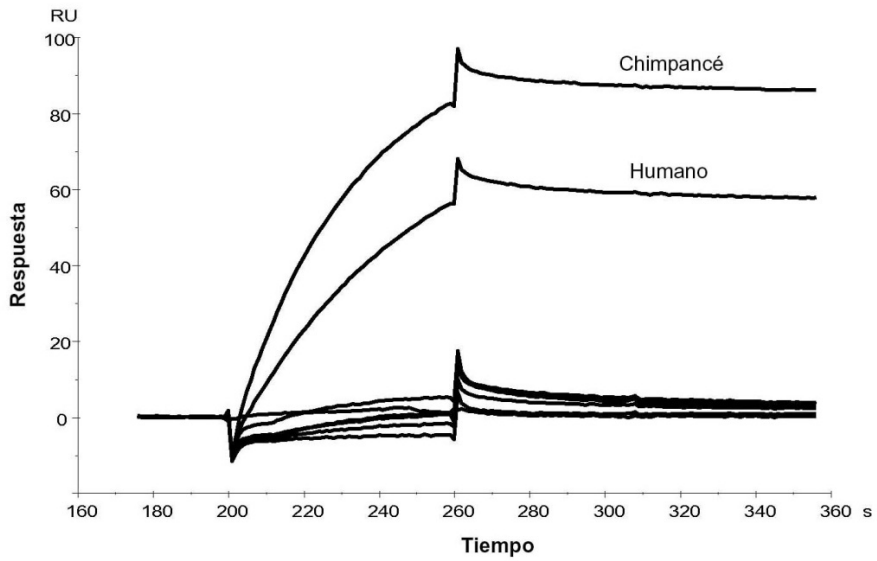


Fig. 4

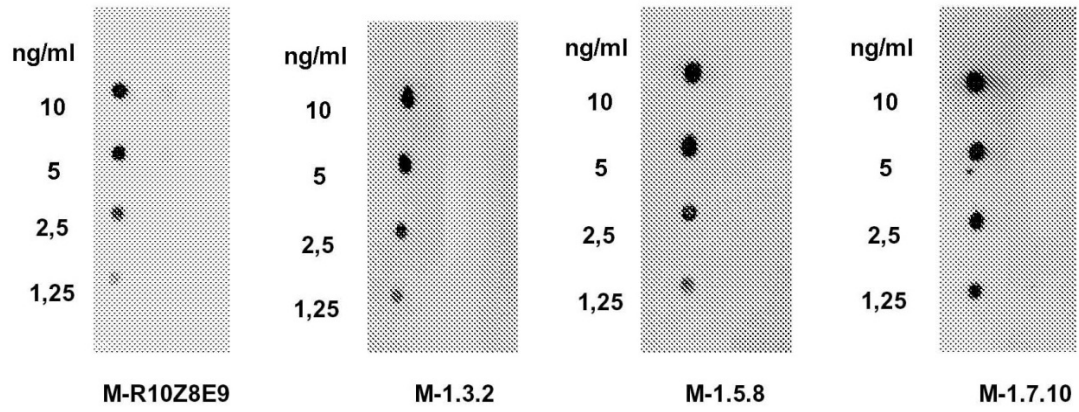


Fig. 5

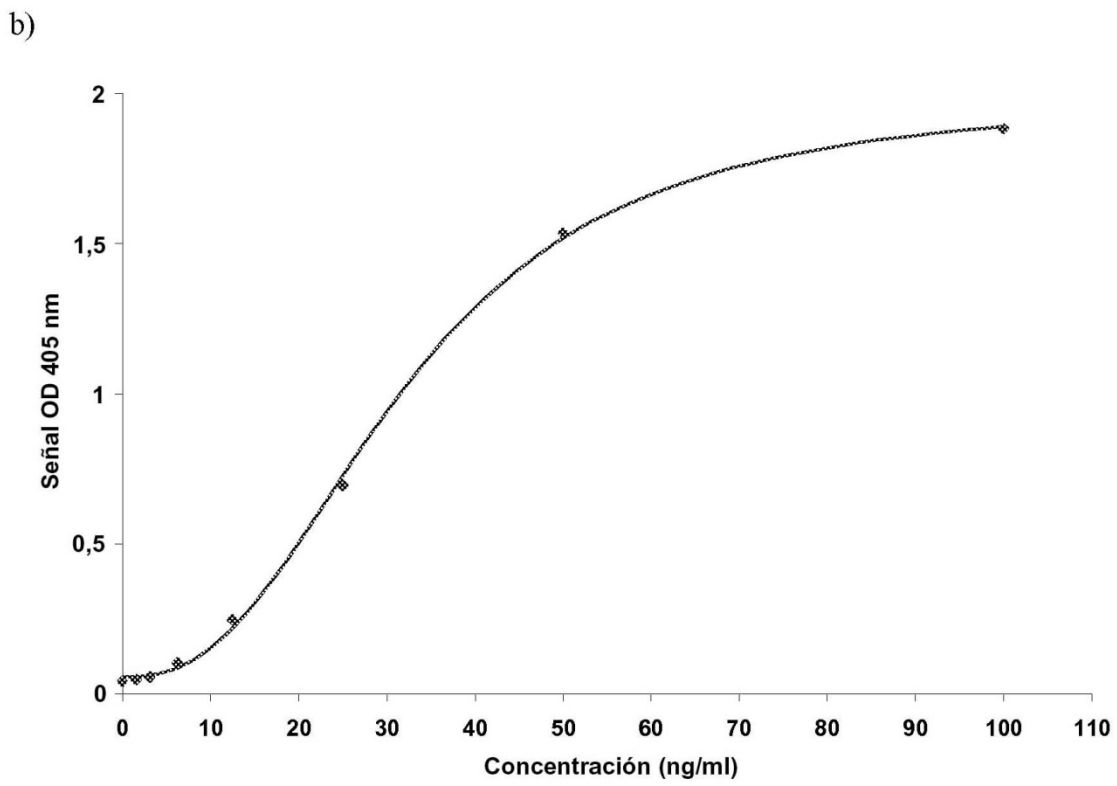
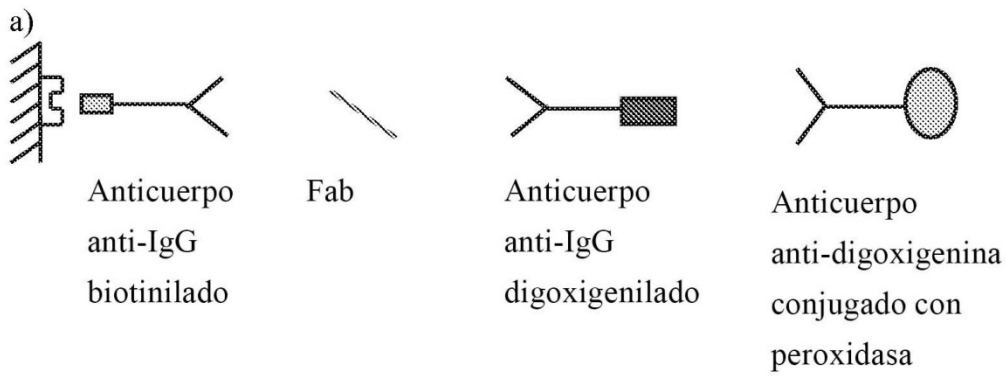


Fig. 6

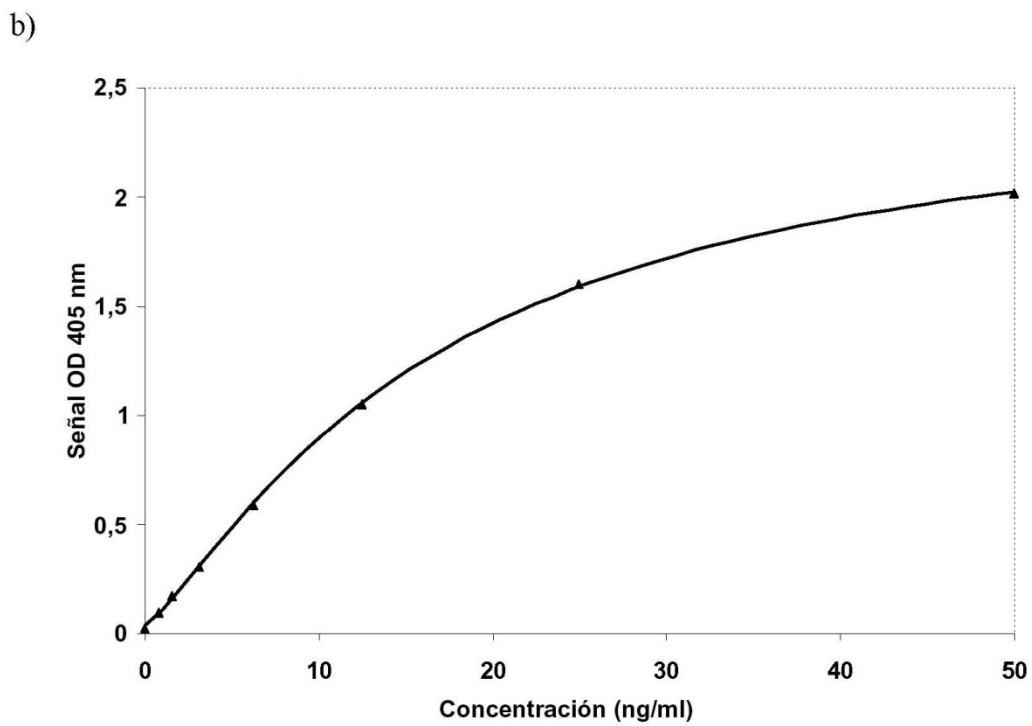
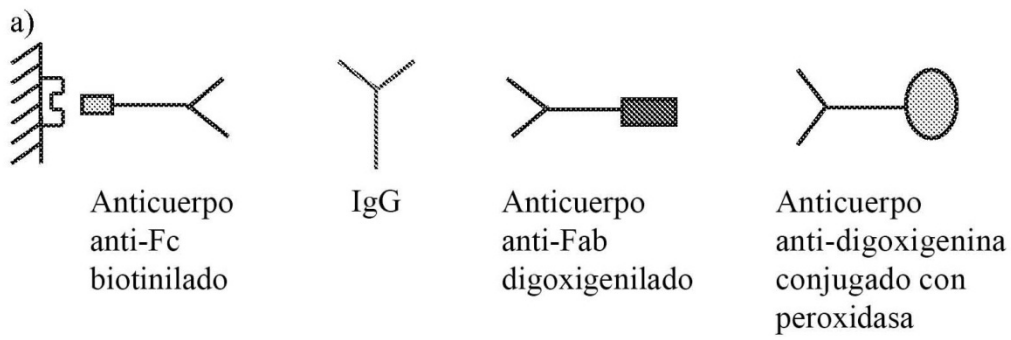


Fig. 7

