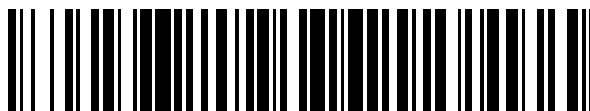


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 906**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/536** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014 PCT/EP2014/073523**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014 E 14792817 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 3066469**

54 Título: **Método para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en presencia de una molécula ligante, así como kits, composiciones y usos relacionados con el mismo**

30 Prioridad:

**05.11.2013 EP 13005218**  
**11.06.2014 EP 14002015**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.02.2018**

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**68305 Mannheim, DE y**  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHRAEML, MICHAEL;**  
**ROESSLER, MARKUS y**  
**GERG, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 654 906 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

Método para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en presencia de una molécula ligante, así como kits, composiciones y usos relacionados con el mismo

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en presencia de una molécula ligante, así como a kits, composiciones y usos relacionados con el mismo.

10 En el contexto de muchas aplicaciones que utilizan moléculas ligantes, por ejemplo para anticuerpos terapéuticamente activos dirigidos contra una diana en un animal o ser humano, existe una necesidad de métodos que permitan la determinación de dicha diana en presencia de la molécula ligante sin la necesidad de eliminar la molécula ligante antes de la determinación de la cantidad o concentración de la diana. En particular para, por ejemplo, anticuerpos terapéuticamente activos o receptores terapéuticamente activos o fragmentos de receptor, existe una necesidad de métodos in vitro que permitan la determinación en muestras corporales de la cantidad total o concentración de la diana  
15 contra la que se dirige el anticuerpo terapéuticamente activo o receptor terapéuticamente activo o fragmentos de receptor, sin eliminar de la muestra el anticuerpo terapéuticamente activo o el receptor terapéuticamente activo o la proteína de fusión. De esta manera, la cantidad total comprende tanto diana libre, como diana no ligada como diana ligada al anticuerpo terapéuticamente activo, receptor terapéuticamente activo o fragmentos de receptor.

20 Salimi-Moosavi et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 51:1128,1133, 2010 y Lee et al., AAPS J 13:99-110, 2011 describen enfoques de cuantificación de un analito en presencia de un anticuerpo terapéutico ligante del analito, en el que el anticuerpo se desnaturaliza con el fin de disociar el anticuerpo respecto del analito. Suzuki et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 648-654, 1999 sugieren la utilización de un anticuerpo antiidiotípico en aplicaciones de ELISA. La presente invención proporciona la disponibilidad de dichos métodos, que implican una molécula atrapadora y kits que pueden utilizarse en los métodos de la invención.

25 En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en presencia de una molécula de unión capaz de unirse mediante su sitio de unión al analito, comprendiendo el método las etapas de:

30 (i) poner en contacto una muestra que comprende el analito y la molécula de unión con:

- una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión y
- una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito y

35 (ii) detectar el complejo de molécula de detección-analito, determinando de esta manera la cantidad total y/o la concentración del analito, en el que la molécula de detección es diferente de la molécula de unión y en el que el analito es diferente de la molécula atrapadora y  
40 en el que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión, y en el que la molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor.

45 Como primera etapa, se pone en contacto una muestra que comprende el analito y la molécula de unión con una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión y una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito.

50 El analito que debe medirse puede ser cualquier compuesto químico. Típicamente, dicho analito puede ser un analito presente en una muestra biológica, en particular un líquido corporal procedente de un ser humano o de un animal. En particular, el analito puede ser un biomarcador, péptido y/o proteína.

55 La muestra que comprende el analito puede ser un líquido, gel o composición licuable, preferentemente un líquido. Dicho líquido puede ser una solución, suspensión o emulsión. En particular, la muestra es una muestra biológica, en particular una muestra corporal obtenida de un ser humano o animal, o mezclas de las mismas. Dicha muestra corporal puede utilizarse directamente tras la extracción a partir de un sujeto o puede almacenarse bajo condiciones adecuadas, por ejemplo mediante congelación, con el fin de llevar a cabo el método de la invención en un punto deseado del tiempo. En particular, pueden medirse muestras de diversos sujetos y/o diferentes puntos temporales con el fin de comparar los sujetos o para realizar un seguimiento de una terapia. La extracción de una muestra corporal  
60 puede ser llevada a cabo por un experto, dependiendo de la muestra. En una realización preferente, la muestra corporal es sangre o suero sanguíneo. En este caso, se extrae sangre de un sujeto. Puede obtenerse suero sanguíneo mediante métodos conocidos de la técnica. De manera similar, pueden obtenerse otras muestras corporales, mediante, por ejemplo, la recolección de orina, o realizando una biopsia, y mediante tratamiento posterior de la muestra, en caso necesario.

65 Tal como se ha indicado anteriormente, la muestra comprende el analito y una molécula de unión capaz de unirse

mediante su sitio de unión al analito. Dicha molécula de unión puede ser cualquier tipo de molécula que sea capaz de unión al analito. Dicha unión preferentemente es reversible y no covalente. Preferentemente, dicha molécula de unión es o comprende una proteína o péptido. Más preferentemente, la molécula de unión comprende un anticuerpo, una parte funcionalmente activa de un anticuerpo, un receptor o un fragmento de receptor, en particular un anticuerpo terapéutica y/o diagnósticamente activo o parte funcionalmente activa terapéutica y/o diagnósticamente activa o receptor terapéutica y/o diagnósticamente activo o fragmento de receptor terapéutica y/o diagnósticamente activo. De esta manera, la molécula de unión es, en una realización preferente, un agente terapéutico y/o diagnóstico. A título de ejemplo, la molécula de unión es un agente terapéutico que se administra en el sujeto humano que lo necesita. En el cuerpo del sujeto, la molécula de unión se une al analito, que representa en este escenario la diana del agente terapéutico. Tras extraer la muestra del sujeto, la muestra típicamente comprenderá tanto analito como agente terapéutico. Debido a que el agente terapéutico puede unirse al analito, parte o la totalidad del analito se unirá al agente terapéutico.

La molécula de unión es capaz de unión mediante su sitio de unión al analito. Un sitio de unión es una región en una molécula, en particular una proteína, ADN o ARN, más preferentemente una proteína, a la que puede unirse por lo menos otra molécula específica de manera no covalente y reversiblemente. En el caso de anticuerpos que reconocen un antígeno como pareja preferente de la molécula de unión y antígeno, el sitio de unión con frecuencia se denomina sitio de unión de antígeno y el sitio al que se une el sitio de unión con frecuencia se denomina epitopo. Los sitios de unión existen en los anticuerpos como regiones codificadas específicamente que se unen a los antígenos basándose en su estructura, tal como se explica posteriormente en mayor detalle.

Como primera etapa en el método de la invención, se pone en contacto una muestra que comprende el analito y la molécula de unión con una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión y una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito. La molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor según la presente invención. Entre otras moléculas de captura indicadas se incluyen cualquier compuesto químico, por ejemplo una proteína. La molécula atrapadora está dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión, lo que implica que la molécula atrapadora es capaz de unión a dicho sitio de unión de la molécula de unión de manera covalente o no covalente, preferentemente de manera no covalente. En una realización preferente adicional, la molécula atrapadora es un anticuerpo antiidiotipo. Un anticuerpo antiidiotipo o parte funcionalmente activa del mismo es un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo dirigida contra la parte específica de antígeno de un anticuerpo y, de esta manera, reconoce el sitio de unión de otro anticuerpo. En dicha realización, la molécula de unión también es un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo.

La molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito puede ser cualquier tipo de compuesto químico, preferentemente es una proteína, ADN o ARN, más preferentemente una proteína, todavía más preferentemente un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo, con la condición previa de que la molécula de detección sea diferente de la molécula de unión. En una realización también preferente, la molécula de detección es un anticuerpo o parte funcionalmente activa. La molécula de detección porta medios para marcar detectablemente con un marcaje detectable, en particular medios para la detección directa o indirecta. Dichos medios y marcajes se indican posteriormente en mayor detalle. El hecho de que la molécula de detección sea diferente de la molécula de unión debe entenderse en el sentido de que ambas moléculas son moléculas diferentes, incluso ignorando los medios para el marcaje detectable, más preferentemente sus sitios de unión capaces de unirse al analito son diferentes. En el caso de la molécula de unión y la molécula de detección, comprendiendo ambas o siendo un anticuerpo o parte funcionalmente activo del mismo, los sitios de unión a antígeno preferentemente son diferentes, más preferentemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de RDC correspondientes (RDGP 1, 2 y 3, y RDCL 1, 2 y 3) son diferentes.

La molécula de detección es capaz de formar un complejo con el analito. Lo anterior implica que la molécula de detección puede unirse al analito de manera covalente o no covalente. En el caso de la unión no covalente, tal como en el caso de la unión de anticuerpo-antígeno, la molécula de detección preferentemente muestra una afinidad suficientemente elevada para su analito para la formación de complejo. Por lo tanto, en una realización preferente adicional, la afinidad de la molécula de detección para la unión al analito es de por lo menos  $10^8$  (moles/l)<sup>-1</sup>, más preferentemente es de  $10^9$  (moles/l)<sup>-1</sup>, todavía más preferentemente es de por lo menos  $10^{10}$  (moles/l)<sup>-1</sup>. La afinidad puede determinarse mediante métodos conocidos de la técnica, en particular mediante mediciones de resonancia del plasmón superficial, en particular utilizando el sistema BiaCore®. Además, la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión. Tal como se ilustra en la figura 1B, dicha molécula de detección sólo formará un complejo con el analito en el caso de que la molécula de unión sea liberada del analito mediante la unión de la molécula de unión a la molécula atrapadora.

Según la invención, se pone en contacto una muestra que comprende el analito y la molécula de unión con una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión y una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito. La puesta en contacto puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos de la técnica. En particular, puede proporcionarse una muestra en un recipiente adecuado y puede añadirse la molécula atrapadora y la molécula de detección separada o simultáneamente, por ejemplo mediante el pipeteado de soluciones que comprenden la molécula atrapadora y/o la molécula de detección; sin embargo, la secuencia de la puesta en contacto de los componentes no es crítica. Entre las condiciones adecuadas se incluyen una temperatura y solución

apropiadas para evitar, por ejemplo, modificaciones químicas no deseadas de los compuestos, la pérdida de la capacidad de unión respectiva, la desnaturalización de las proteínas implicadas o para mantener la viabilidad de las células, en caso de hallarse presentes.

5 El hecho de que la molécula atrapadora sea diferente del analito debe entenderse en el sentido que ambas moléculas son moléculas diferentes. En una realización preferente, sus sitios de unión capaces de unión a la molécula de unión son diferentes. En el caso de que la molécula atrapadora y el analito comprendan o sean ambas un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo, los sitios de unión a antígeno preferentemente son diferentes, más preferentemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de RDC correspondientes (RDCP 1, 2 y 3, y RDCL 1, 2 y 3) son diferentes.

10 Las condiciones adecuadas para llevar a cabo el método de la invención dependerán del diseño del ensayo particular y de los componentes seleccionados, y el experto en la materia será capaz de seleccionarlos basándose en sus conocimientos generales. Las etapas de incubación pueden variar entre aproximadamente 5 segundos y varias horas, preferentemente entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, marcaje, volumen de solución, concentraciones y similares. Habitualmente, los ensayos se llevan a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden llevarse a cabo en un intervalo de temperaturas, tales como 10°C a 95°C o 15°C a 40°C. Además, el recipiente utilizado dependerá del formato de ensayo, marcaje, volumen de solución, concentraciones y similares.

20 El método de la invención permite determinar la cantidad total y/o la concentración de dicho analito. En la muestra, se encuentra presente tanto el analito como la molécula de unión. Debido a que las moléculas con frecuencia ocupan sitios de unión adecuados en el analito y/o perjudican la unión de una molécula de detección debido a motivos estéricos, resulta difícil la determinación de la cantidad total de analito en la muestra. La cantidad total de analito se refiere al número de moléculas de analito en total en una muestra dada, ambos analitos en estado libre, analito no unido frente a molécula de unión y moléculas de analito que se encuentran unidas a la molécula de unión. De modo análogo, la concentración total de dicho analito en una muestra dada puede determinarse, es decir la concentración de todas las moléculas de analito en una muestra dada, ambos analitos que se encuentran en estado libre, analito no unido frente a la molécula de unión y moléculas de analito que se encuentran unidas a la molécula de unión. La concentración típicamente se expresa como concentración molar o concentración (p/v).

30 Como segunda etapa del método de la invención, se detecta el complejo de molécula de detección-analito. Tal como se ha explicado anteriormente, dicho compuesto puede ser covalente o no covalente. Mediante la ejecución de la primera etapa de la invención, ahora la molécula de detección puede formar un complejo con todas las moléculas de analito presentes en la muestra, ya que las moléculas de unión se encuentran atrapadas por la molécula atrapadora, tal como se ilustra en la figura 1B. Por lo tanto, la detección del complejo de molécula de detección-analito permite determinar la cantidad y/o la concentración de la cantidad total de moléculas e analito, con independencia de si se encontraban unidas inicialmente a una molécula de unión o no. La detección del complejo puede llevarse a cabo de diversas maneras, según el formato del ensayo y/o el marcaje explicado en mayor detalle posteriormente. Los ensayos preferentes son los ensayos no competitivos, en particular los ensayos de tipo sándwich.

40 De esta manera, en una realización preferente de la presente invención, la detección del complejo de molécula de detección-analito se lleva a cabo en un ensayo no competitivo, en particular en un ensayo de tipo sándwich, especialmente en el que el ensayo de tipo sándwich utiliza una molécula de captura capaz de unirse al analito, y en el que:

- 45
- la molécula de captura porta medios para la inmovilización, y
  - la molécula de detección y la molécula de captura se unen a epítopos no solapantes diferentes en el analito.

50 La invención según dicha realización preferente se ilustra en la figura 1. En la presente realización, el analito se captura en un soporte mediante la molécula de captura y de esta manera se inmoviliza. En la muestra, por lo menos algunas de las moléculas de analito se unen a la molécula de unión. En esta situación, la molécula de detección no puede unirse al analito que se une a la molécula de unión (figura 1A), ya que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no pueda unirse a la molécula de unión. Por lo tanto, el analito unido no puede ser detectado en esta situación. Tras la adición de la molécula atrapadora, la molécula de unión es liberada del analito y el analito de detección puede unirse a la molécula de analito (figura 1B). En esta situación, la molécula de detección puede unirse a esencialmente todas las moléculas de analito presentes en la muestra y puede determinarse la cantidad total o concentración de analito.

60 En dicha realización preferente, una molécula de captura porta medios para la inmovilización y puede utilizarse para la inmovilización. Los medios para la inmovilización pueden permitir la unión a un soporte, preferentemente un soporte sólido, de manera covalente o no covalente.

65 La expresión «soporte sólido» se refiere a un material en el que la fase sólida interactúa con reactivos en la fase líquida mediante reacciones heterogéneas. La utilización de soportes sólidos es bien conocida en los campos de la química, bioquímica, farmacia y biología molecular. Se han desarrollado muchos tipos de soporte sólido según el problema técnico que debe resolverse. Puede utilizarse cualquiera de ellos en el contexto de la presente invención. Por ejemplo,

el soporte sólido utilizado en los métodos de la presente invención puede incluir componentes de sílice, acetato de celulosa, nitrocelulosa, nilón, poliéster, polietersulfona, poliolefina o fluoruro de polivinilideno o combinaciones de los mismos. Entre los soportes sólidos adecuados adicionales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vidrio de poro controlado, placa o portaobjetos de vidrio, poliestireno y dextrano activado. En otros aspectos, los polímeros orgánicos sintéticos, tales como poliacrilamida, polimetacrilato y poliestireno también son superficies de soporte ilustrativas. Además, los polisacáridos tales como celulosa y dextrano son ejemplos ilustrativos adicionales de superficies de soporte. Otras superficies de soporte, tales como fibras, también son operables.

Entre los soportes de resina comunes utilizados en, por ejemplo, química combinatorial o de proteínas se incluyen la resina de poliestireno, por ejemplo entrecruzada con divinilbenceno, hidroximetilpoliestireno, aminometilpoliestireno, resina TentaGel (TG) y ArgoGel (AG), copolímeros de injerto de poliestireno/DVB-polietilenglicol (PS-EG) - Bayer, coronas/pins (CP) (soporte de polietileno/polipropileno injertado por radiación), Kieselguhr/resinas a base de poliacrilamida (KPA), vidrio de poro controlado, copolímero de PEGA-polietilenglicol/dimetilacrilamida.

La inmovilización en un soporte sólido puede conseguirse utilizando soportes sólidos que han sido modificados o activados para incluir grupos funcionales que permiten el acoplamiento covalente de la entidad o soporte a la molécula de captura, por ejemplo una proteína. Típicamente, se utilizan brazos de conector alifático. Las moléculas de captura, en particular proteínas, también pueden unirse no covalentemente a una superficie mediante, por ejemplo, mecanismos iónicos o hidrofóbicos y son desconectados mediante la inhibición de estos mecanismos localmente por el liberador. Además, la unión covalente de una molécula de captura, por ejemplo una proteína, a una superficie, por ejemplo una superficie de vidrio o de óxido de metal, puede llevarse a cabo en primer lugar activando la superficie con un aminosilano. A continuación, las moléculas de captura derivatizadas con grupos funcionales reactivos con amina pueden unirse a la superficie. Los soportes, en particular los soportes sólidos, pueden derivatizarse con proteínas, tales como enzimas, péptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, mediante unión covalente o no covalente mediante uno o más sitios de unión, uniendo de esta manera el mismo ácido al soporte sólido.

El soporte (sólido) puede encontrarse contenido en un recipiente, en el que el recipiente es un tubo, tal como un tubo para centrífuga o tubo de centrífuga, jeringas, cartucho, cámara, placa multipocillo o probeta, o combinaciones de los mismos. El soporte (sólido) puede pretratarse o funcionalizarse con el fin de permitir la unión mediada por conector de las moléculas de captura. En una realización, el soporte sólido puede ser fibroso o particulado, permitiendo habitualmente el contacto apropiado. El tamaño del soporte (sólido) adecuado para la utilización en el método de la presente invención puede variar según el método seleccionado. Las moléculas de captura pueden unirse a un soporte (sólido) únicamente (por ejemplo, un recipiente o placa multipocillo) o pueden unirse a una multitud de soportes (sólidos) (por ejemplo, perlas). La forma del soporte (sólido) adecuada para la utilización en los métodos de la presente invención puede ser, por ejemplo, una hoja, un disco precortado, cilindro, monofibra o un soporte sólido compuesto de partículas. En una realización, el soporte (sólido) puede ser fibroso o particulado, permitiendo un contacto óptimo. El tamaño del soporte (sólido) puede variar y puede seleccionarse según el método que debe llevarse a cabo.

En algunas realizaciones, la fase sólida es una tira de ensayo, un chip, en particular una micromatriz o chip nanomatriz, una placa de microtitulación o una micropartícula.

Resulta ventajoso conseguir la liberación esencialmente completa del analito respecto de la molécula de unión tras la adición de la molécula atrapadora, ya que ello facilita la determinación correcta de la cantidad total de analito en la muestra, tal como se ilustra en la figura 1B. Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, la molécula atrapadora facilita la liberación esencialmente completa del analito respecto de la molécula de unión.

La expresión «liberación esencialmente completa» según la presente invención se entiende como menos de 10%, preferentemente menos de 5%, más preferentemente menos de 1% de las moléculas de analito se encuentran unidas a una molécula de unión en la muestra tras la etapa (i) de la invención.

Según la presente invención,  $K(\text{capt})$  es la afinidad de la molécula atrapadora para la molécula de unión y  $K(\text{molécula de unión})$  es la afinidad de la molécula de unión para el analito.

El término «afinidad» define la fuerza de la interacción entre las dos especies y se determina preferentemente mediante resonancia del plasmón superficial, en particular utilizando el sistema BiaCore®. En el caso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, la afinidad se determina como el valor de  $K_D$  determinado preferentemente mediante resonancia del plasmón superficial, en particular utilizando el sistema BiaCore®. La determinación de la afinidad puede llevarse a cabo tal como se indica en "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics", Current Opinion in Immunology, volumen 5, número 2, 1993, páginas 282 a 286.

Además, según la invención,  $\text{Conc}(\text{capt})$  y  $\text{Conc}(\text{molécula de unión})$  son las concentraciones molares de la molécula atrapadora y la molécula de unión, respectivamente, en la etapa i) del método de la invención, anteriormente.

Además, según la invención,  $\text{MR}(\text{capt})$  es la valencia de unión de la molécula atrapadora para la unión a la molécula de unión y  $\text{MR}(\text{molécula de unión})$  es la valencia de unión de la molécula de unión para la unión al analito.

La expresión «valencia de unión» según la presente invención se entiende como el número determinado experimentalmente de sitios de unión para una pareja dada de parejas de unión. En el caso de anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos, la valencia de unión teórica típicamente es de 1 o 2, pero las valencias de unión determinadas experimentalmente pueden ser valores no enteros (por ejemplo 1,4) debido a efectos estéricos. En el caso de anticuerpos anticuerpo antiidiotipo, como moléculas de captura preferentes la valencia de unión teórica típicamente es de 1. Nuevamente, la valencia de unión determinada experimentalmente puede ser un valor no entero (por ejemplo 0,9) debido a efectos estéricos. La determinación de la valencia de unión puede llevarse a cabo tal como se indica en Schraeml M. et al., *Methods in Molecular Biology* 901:171-181, 2012.

Con el fin de alcanzar una liberación esencialmente completa de la molécula de unión respecto del analito, resulta ventajoso que la afinidad de la molécula atrapadora para la molécula de unión sea por lo menos 3 veces superior a la afinidad de la molécula de unión para el analito. Por lo tanto, en una realización preferente adicional, la  $K(\text{capt}) / K(\text{molécula de unión})$  es por lo menos 3, preferentemente 5, más preferentemente por lo menos 10.

Con el fin de conseguir una liberación esencialmente completa de la molécula de unión respecto del analito, resulta ventajoso adicionalmente que la concentración de la molécula atrapadora sea por lo menos 3 veces superior a la concentración de la molécula de unión. Por lo tanto, en una realización preferente todavía adicional,  $\text{Conc}(\text{capt.}) / \text{Conc}(\text{molécula de unión})$  es de por lo menos 3, preferentemente 5, más preferentemente de por lo menos 10, particularmente en la que  $\text{Conc}(\text{molécula de unión})$  se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 y 5  $\mu\text{moles/l}$  y/o  $\text{Conc}(\text{capt})$  se encuentra comprendida en el intervalo de  $3 \cdot (1 \text{ a } 5) \mu\text{moles/l}$ .

Resulta todavía más ventajoso para conseguir una liberación esencialmente completa de la molécula de unión respecto del analito que se consideren las afinidades respectivas y las concentraciones comentadas anteriormente; en particular, resulta preferente que la afinidad de la molécula atrapadora para la molécula de unión multiplicada por la concentración molar de la molécula atrapadora sea por lo menos 3 veces superior a la afinidad de la molécula de unión para el analito multiplicada por la concentración molar de la molécula de unión. Por lo tanto, en una realización también preferente,  $(K(\text{capt}) / K(\text{molécula de unión})) \times (\text{Conc}(\text{capt}) / \text{Conc}(\text{molécula de unión}))$  es por lo menos 3, preferentemente 5, más preferentemente por lo menos 10.

Otro aspecto importante es la valencia de unión de la molécula de unión y la molécula atrapadora utilizada en el método de la invención, en particular en el caso de que la molécula de unión y/o la molécula atrapadora sean anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos. En la unión a analitos pequeños, una molécula de unión que es un anticuerpo típicamente muestra una valencia de unión de  $\text{MR}=2$ , mientras que por motivos estéricos, la molécula atrapadora que es un anticuerpo antiidiotipo típicamente muestra una valencia de unión de  $\text{MR}=1$  e inferior. En este caso, preferentemente debe considerarse el cociente de molaridad funcional.

Por lo tanto, en una realización preferente todavía adicional,  $(K(\text{capt}) / K(\text{molécula de unión})) \times (\text{Conc}(\text{capt}) / \text{Conc}(\text{molécula de unión})) \times (\text{MR}(\text{capt}) / \text{MR}(\text{molécula de unión}))$  es por lo menos 3, preferentemente 5, también preferentemente por lo menos 10.

Resulta adicionalmente ventajoso determinar la cantidad total de analito en el caso de que la molécula de detección, que se pretende que se una al analito, muestre una afinidad suficientemente elevada para dicho analito. Por lo tanto, en una realización preferente adicional, la afinidad de la molécula de detección para la unión al analito es de por lo menos  $10^8 (\text{moles/l})^{-1}$ , más preferentemente de  $10^9 (\text{moles/l})^{-1}$ , todavía más preferentemente de por lo menos  $10^{10} (\text{moles/l})^{-1}$ .

Resulta adicionalmente ventajoso para determinar la cantidad total de analito que la afinidad de la molécula atrapadora para la unión a la molécula de unión sea suficientemente elevada para conseguir una liberación esencialmente completa de la molécula de unión respecto del analito. Por lo tanto, en una realización preferente todavía adicional, la afinidad de la molécula atrapadora para la unión a la molécula de unión es de por lo menos  $5 \times 10^9 (\text{moles/l})^{-1}$ , más preferentemente es de por lo menos  $10^{10} (\text{moles/l})^{-1}$ .

Resulta adicionalmente ventajoso que la molécula de detección muestre especificidad para el analito con el fin de minimizar la detección de falsos positivos del analito. Por lo tanto, en una realización preferente, la molécula de detección se une al analito específicamente, en particular la unión de la molécula de detección a una diana diferente del analito es como máximo 5% de la unión de la molécula de detección al analito.

Además, resulta ventajoso que la molécula de captura muestre especificidad para la molécula de unión, en particular para minimizar la pérdida de la molécula atrapadora y para maximizar la unión a la molécula de unión. Por lo tanto, preferentemente, la molécula atrapadora se une a la molécula de unión específicamente, en particular la unión de la molécula atrapadora a una diana diferente de la molécula de unión es como máximo de 5% de la unión de la molécula atrapadora a la molécula de unión.

El término «específico» o «especificidad» en referencia a la unión de una molécula a otra molécula, tal como la unión de la molécula atrapadora a la molécula de unión, se refiere al reconocimiento, contacto y formación de un complejo

estable entre el identificador y el objeto diana, junto con sustancialmente menos reconocimiento, contacto o formación de complejo del identificador con objetos diferentes del objeto diana (a los que también se hace referencia como otros objetos). En un aspecto, «específico» en referencia a la unión del identificador al objeto diana se refiere a que, en la medida en que el identificador reconoce y forma un complejo con el objeto diana, forma el mayor número de complejos con el objeto diana en comparación con los otros objetos. En un aspecto, este número máximo es de por lo menos 50% de la totalidad de dichos complejos formados por el identificador con el objeto diana, preferentemente por lo menos 75%, más preferentemente como máximo de 80% o 90%, todavía más preferentemente de como máximo 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Generalmente, las moléculas que participan en un suceso de unión específico presentan áreas sobre sus superficies o cavidades que dan lugar al reconocimiento específico entre las moléculas que se unen unas a otras. Entre los ejemplos de unión específica se incluyen interacciones de anticuerpo-antígeno, interacciones de enzima-sustrato, formación de dúplex o tríplex entre polinucleótidos y/o oligonucleótidos, interacciones de receptor-ligando y similares.

Además, resulta ventajoso que se requieran cantidades comparativamente pequeñas de molécula de detección. Por lo tanto, en una realización preferente adicional, la concentración molar de la molécula de detección es como máximo de 5%, preferentemente de como máximo 3%, más preferentemente de como máximo 1%, todavía más preferentemente de como máximo 0,5%, más preferentemente de como máximo 0,1% de la concentración molar de la molécula de unión en la muestra.

En una realización preferente todavía adicional, la concentración de la molécula atrapadora se encuentra comprendida en el intervalo de  $3 * (1 \text{ a } 5) \mu\text{moles/l}$  a  $5 * (1 \text{ a } 5) \mu\text{moles/l}$ , tal como  $3 * (1, 2, 3, 4 \text{ o } 5) \mu\text{moles/l}$  a  $5 * (1, 2, 3, 4 \text{ o } 5) \mu\text{moles/l}$ , particularmente  $3 \text{ a } 5 \mu\text{moles/l}$ ,  $3 \text{ a } 10 \mu\text{moles/l}$ ,  $3 \text{ a } 15 \mu\text{moles/l}$ ,  $3 \text{ a } 20 \mu\text{moles/l}$ ,  $3 \text{ a } 25 \mu\text{moles/l}$ ,  $5 \text{ a } 25 \mu\text{moles/l}$ ,  $10 \text{ a } 25 \mu\text{moles/l}$ ,  $15 \text{ a } 25 \mu\text{moles/l}$ , tal como se ilustra en el Ejemplo 2B.

Tal como se ha indicado anteriormente, el método de la presente invención en particular resulta en particular útil para determinar la cantidad total de una determinada diana (por ejemplo, un analito) en presencia de una molécula de unión, siendo en particular un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo, por ejemplo un anticuerpo terapéuticamente activo que se une a dicho analito en un líquido o tejido corporal.

Dicho anticuerpo terapéuticamente activo puede comprender un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo a la que se une una fracción terapéutica y/o diagnóstica de manera covalente o no covalente. Por ejemplo, un radionucleido, toxina, citoquina o agente citotóxico puede unirse covalente o no covalentemente al anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo. En el caso de que la fracción terapéutica y/o diagnóstica sea una proteína o péptido, la molécula de unión puede ser una proteína de fusión que comprende un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo. Alternativamente, la molécula de unión puede ser terapéuticamente activa como tal, por ejemplo como anticuerpo neutralizante. Por lo tanto, en una realización preferente todavía adicional, la molécula de unión es o comprende un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo.

Como molécula atrapadora, puede utilizarse para la molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo terapéuticamente activo o receptor terapéuticamente activo) un anticuerpo antiidiotipo o una parte funcionalmente activa del mismo. Un anticuerpo antiidiotipo o parte funcionalmente activa del mismo se une al sitio de unión de la molécula de unión y tras la unión, impide la unión de la molécula de unión al analito. A continuación, la molécula de detección puede unirse al analito libre. Nuevamente, dicho anticuerpo antiidiotipo o parte funcionalmente activa del mismo puede comprender fracciones adicionales unidas covalente o no covalentemente al anticuerpo, tal como, por ejemplo, una fracción diagnóstica o medios de inmovilización.

De esta manera, en una realización preferente todavía adicional, la molécula atrapadora es o comprende un anticuerpo antiidiotipo dirigido contra el sitio de unión a antígeno de la molécula de unión o parte funcionalmente activa del mismo. La generación de anticuerpo antiidiotipo o partes funcionalmente activas de los mismos es bien conocida por el experto en la materia y se describe en, por ejemplo, Sege K et al., PNAS 75(5): 2443-2447, 1978 y Pan Y. et al., FASEB J. 9(1):43-49, 1995.

Además, como molécula de detección, puede utilizarse un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo que es capaz de unión al analito. La generación de anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos es bien conocida, tal como se describe posteriormente en mayor detalle. Por lo tanto, en una realización preferente todavía adicional, la molécula de detección es o comprende un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo.

En métodos preferentes de la invención, se utiliza una molécula de captura que porta medios para la inmovilización y es capaz de unión al analito (ver la figura 1). Nuevamente, los anticuerpos y partes funcionalmente activas de los mismos y su generación son bien conocidos de la técnica, tal como se indica posteriormente. De esta manera, en una realización preferente todavía adicional, la molécula de captura es o comprende, por lo tanto, un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo, más preferentemente, la molécula de captura comprende un anticuerpo una parte funcionalmente activa del mismo y medios para la inmovilización.

En una realización también preferente, la molécula atrapadora, la molécula de unión, la molécula de detección y la molécula de captura son o comprenden, cada una, anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos.

En una realización preferente todavía adicional, la molécula de unión es o comprende un anticuerpo, una parte funcionalmente activa de un anticuerpo, un receptor o un fragmento de receptor, en particular un anticuerpo terapéutica y/o diagnósticamente activo o parte funcionalmente activa terapéutica y/o diagnósticamente activa de un anticuerpo o receptor terapéutica y/o diagnósticamente activo o fragmento de receptor terapéutica y/o diagnósticamente activo. De esta manera, la molécula de unión es, en una realización preferente, un agente terapéutico y/o diagnóstico.

De esta manera, en una realización preferente adicional, la molécula atrapadora, la molécula de detección y la molécula de captura son o comprenden, cada una, anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos, y la molécula de unión es o comprende un anticuerpo, una parte funcionalmente activa de un anticuerpo, un receptor o un fragmento de receptor, en particular un anticuerpo terapéuticamente activo o parte funcionalmente activa terapéuticamente activa de un anticuerpo o receptor terapéuticamente activo o fragmento de receptor terapéuticamente activo.

Un ejemplo de una molécula de unión que comprende un fragmento de receptor terapéuticamente activo es aflibercept (también denominado VEGF Trap; Moroney et al. (Future Oncol. 5(5):591-600, 2009). VEGF Trap es una proteína de fusión recombinante, en la que el dominio de unión del receptor de VEGF (por sus siglas en inglés, factor de crecimiento vascular endotelial) soluble se combina con el fragmento Fc de IgG. VEGF Trap se une a todas las isoformas de VEGF. VEGF-Trap se describe como útil para el tratamiento de la degeneración macular húmeda y para el tratamiento del cáncer.

Los anticuerpos naturales son proteínas plasmáticas globulares (~150 kDa ([http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton\\_unit](http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton_unit))) que también son conocidas como inmunoglobulinas que comparten una estructura básica. Debido a que presentan cadenas sacáridas añadidas a los residuos aminoácidos, son glucoproteínas. La unidad funcional básica de cada anticuerpo es un monómero de inmunoglobulina (Ig) (que contiene únicamente una unidad de Ig); los anticuerpos secretados también puede ser diméricos, con dos unidades de Ig, tal como IgA; tetraméricas, con cuatro unidades de Ig, tal como IgM de los peces teleósteos, o pentaméricas, con cinco unidades de Ig, tal como la IgM de los mamíferos. En la presente invención, entre los ejemplos de formatos adecuados se incluyen el formato de los anticuerpos naturales, incluyendo los isótipos de anticuerpo conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

El monómero de ig es una molécula en forma de Y que consiste en cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas mediante enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Cada cadena pesada presenta una longitud de aproximadamente 440 aminoácidos; cada cadena ligera presenta una longitud de aproximadamente 220 aminoácidos. Las cadenas pesadas y ligeras contienen, cada una, enlaces disulfuro intracadena que estabilizan su plegamiento. Cada cadena está compuesta de dominios estructurales denominados dominios de Ig. Estos dominios contienen aproximadamente 70 a 110 aminoácidos y se clasifican en diferentes categorías (por ejemplo, variables o V, y constantes o C) según su tamaño y función. Presentan un plegamiento de inmunoglobulina característico en el que dos láminas beta crean una forma de tipo «sándwich» que se mantiene mediante interacciones entre cisteínas conservadas y otros aminoácidos con carga.

Existen cinco tipos de cadena pesada de Ig de mamífero, denominados  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ . El tipo de cadena pesada presente define el isotipo del anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente.

Las cadenas pesadas diferentes difieren en su tamaño y composición, las  $\alpha$  y  $\gamma$  contienen aproximadamente 450 aminoácidos y las  $\delta$ , aproximadamente 500 aminoácidos, mientras que  $\mu$  y  $\epsilon$  presentan aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada presenta dos regiones: la región constante (CH) y la región variable (VH). En una especie, la región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo pero difiere en anticuerpos de isotipo diferente. Las cadenas pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  presentan una región constante compuesta de tres dominios de Ig en tándem y una región bisagra que aporta flexibilidad; las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\epsilon$  presentan una región constante compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina. La región variable de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes células B, pero es la misma para todos los anticuerpos producidos por una única célula B o clon de células B. La región variable de cada cadena pesada presenta una longitud aproximada de 110 aminoácidos y está compuesta de un único dominio de Ig.

En los mamíferos existen dos tipos de cadena ligera de inmunoglobulina, denominados  $\lambda$  y  $\kappa$ . Una cadena ligera presenta dos dominios sucesivos: un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL). La longitud aproximada de una cadena ligera es de entre 211 y 217 aminoácidos. Cada anticuerpo contiene dos cadenas ligeras que siempre son idénticas; en mamíferos, sólo se encuentra presente un tipo de cadena ligera,  $\kappa$  o  $\lambda$ , en cada anticuerpo. Se encuentran otros tipos de cadena ligera, tales como la cadena I, en los vertebrados inferiores, tales como los Condrictios y los Teleósteos.

Además de los anticuerpos naturales, se han desarrollado formatos de anticuerpos artificiales, incluyendo fragmentos de anticuerpos. Algunos de ellos se describen posteriormente.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, la propiedad única de un anticuerpo dado está



determinada por las regiones variables (V), tal como se ha detallado anteriormente. Más específicamente, los bucles variables, tres en cada una de las cadenas ligeras (VL) y tres en cada una de las cadenas pesadas (VH), son responsables de la unión al antígeno, es decir, de su especificidad de antígeno. Estos bucles se denominan regiones determinantes de complementariedad (RDC). Debido a que las RDC de los dominios tanto VH como VL contribuyen al sitio de unión a antígeno, es la combinación de las cadenas pesadas y ligeras, y no ninguna de ellas por sí sola, la que determina la especificidad de antígeno final.

De acuerdo con lo anterior, el término «anticuerpo» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier polipéptido que presenta similitud estructural con un anticuerpo natural y es capaz de unión específica a la diana respectiva, en el que la especificidad de unión está determinada por las RDC. Por lo tanto, el término «anticuerpo» pretende referirse a una estructura derivada de inmunoglobulina con unión a la diana respectiva, incluyendo, aunque sin limitación, un anticuerpo de longitud completa o anticuerpo completo, un fragmento de unión a antígeno (un fragmento derivado, física o conceptualmente, de una estructura de anticuerpo), un derivado de cualquiera de los anteriores, una molécula quimérica, una fusión de cualquiera de los anteriores con otro polipéptido o cualquier estructura/composición alternativa que se une selectivamente a la diana respectiva. El anticuerpo o partes funcionalmente activas del mismo pueden ser cualquier polipéptido que comprenda por lo menos un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno consisten en por lo menos un dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, dispuestos de manera que ambos dominios juntos son capaces de unirse al antígeno específico. La «diana respectiva» es el analito en el caso de la molécula de captura, la molécula de unión y la molécula de detección y es la molécula de unión en el caso del anticuerpo antiidiotipo como molécula atrapadora preferente.

Los anticuerpos de «longitud completa» o «completos» se refieren a proteínas que comprenden dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, que comprenden: (1) en términos de las cadenas pesadas, una región variable y una región constante de cadena pesada que comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3, y (2) en términos de las cadenas ligeras, una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera que comprende un dominio, CL. Con respecto a la expresión «anticuerpo completo», se refiere a cualquier anticuerpo que presente una estructura de dominio global típica de un anticuerpo natural (es decir, que comprende una cadena pesada de tres o cuatro dominios constantes y una cadena ligera de un dominio constante, así como los dominios variables respectivos), aunque cada dominio puede comprender modificaciones adicionales, tales como mutaciones, deleciones o inserciones, que no modifican la estructura de dominios global.

Las «partes funcionalmente activas de los anticuerpos» o «fragmentos de anticuerpo» también contienen por lo menos un fragmento de unión a antígeno tal como se ha definido anteriormente y muestran esencialmente la misma función y especificidad de unión que el anticuerpo completo del que se deriva la parte (o fragmento) funcionalmente activa. La digestión proteolítica limitada con papaína corta el prototipo de Ig en tres fragmentos. Dos fragmentos aminoterminales idénticos, que contienen, cada uno, una cadena L entera y aproximadamente la mitad de una cadena H, son los fragmentos de unión a antígeno (Fab). El tercer fragmento, de tamaño similar pero que contiene la mitad carboxilo-terminal de ambas cadenas pesadas con sus enlaces disulfuro intracadena, es el fragmento cristizable (Fc). El Fc contiene carbohidratos, de unión al complemento, y sitios de unión a FcR. La digestión con pepsina limitada rinde un único fragmento  $F(ab')_2$  que contiene ambos trozos Fab y la región bisagra, que incluye el enlace disulfuro intercadena H-H.  $F(ab')_2$  es divalente para la unión de antígenos. El enlace disulfuro de  $F(ab')_2$  puede cortarse con el fin de obtener Fab. Además, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras pueden fusionarse entre sí para formar un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

Debido a que la primera generación de anticuerpos de tamaño completo presentaba algunos problemas, muchos de los anticuerpos de segunda generación comprendían únicamente fragmentos del anticuerpo. Los dominios variables (Fv) son los fragmentos más pequeños con un dominio de unión a antígeno intacto que consiste en un VL y un VH. Dichos fragmentos, con sólo los dominios de unión, pueden generarse mediante enfoques enzimáticos o la expresión de los fragmentos génicos relevantes, por ejemplo en células bacterianas y eucarióticas. Pueden utilizarse enfoques diferentes, por ejemplo el fragmento Fv solo o fragmentos 'Fab' que comprenden uno de los brazos superiores de la «Y» que incluye Fv más los primeros dominios constantes. Estos fragmentos habitualmente se estabilizan mediante la introducción de un enlace polipéptido entre las dos cadenas que resulta en la producción de un Fv de cadena sencilla (scFv). Alternativamente, pueden utilizarse fragmentos Fv unidos mediante disulfuro (dsFv). Los dominios de unión de los fragmentos pueden combinarse con cualquier dominio constante con el fin de producir anticuerpos de longitud completa o pueden fusionarse con otras proteínas y polipéptidos.

Un fragmento de anticuerpo recombinante es el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), que es una parte funcionalmente activa preferente de un anticuerpo según la invención. En general, presenta una afinidad elevada para su antígeno y puede expresarse en una diversidad de huéspedes. Estas propiedades y otras permiten que los fragmentos scFv no sólo resulten aplicables en medicina, sino también potencialmente en aplicaciones biotecnológicas. Tal como se ha detallado anteriormente, en el fragmento scFv, los dominios VH y VL se unen con un conector peptídico hidrofílico y flexible que mejora la expresión y eficiencia de plegamiento. Habitualmente se utilizan conectores de aproximadamente 15 aminoácidos, de entre los cuales el conector  $(Gly_4Ser)_3$  es el utilizado más frecuentemente. Las moléculas de scFv pueden degradarse proteolíticamente de manera sencilla según el conector utilizado. Con el desarrollo de las técnicas e ingeniería genética, estas limitaciones podrían superarse en la práctica

mediante la investigación centrada en la mejora de la función y la estabilidad. Un ejemplo es la generación de fragmentos Fv estabilizados con disulfuro (o unidos mediante disulfuro), en los que el dímero VH-VL es estabilizado mediante un enlace disulfuro intercadena. Las cisteínas se introducen en la interfaz entre los dominios VL y VH, formando un puente disulfuro que mantiene los dos dominios unidos.

5 La disociación de los scFv resulta en scFv monoméricos, que pueden acomplejarse en forma de dímeros (diacuerpos), trímeros (triacuerpos) o agregados de mayor tamaño, tales como TandAbs y Flexicuerpos, que también representan partes funcionalmente activas de un anticuerpo según la invención.

10 Los anticuerpos con dos dominios de unión pueden crearse mediante la unión de dos scFv con un simple enlace polipeptídico (scFv)<sub>2</sub> o mediante la dimerización de dos monómeros (diacuerpos). Los diseños más simples son diacuerpos que presentan dos dominios funcionales de unión a antígeno que pueden ser iguales, similares (anticuerpos bivalentes) o presentar especificidad para antígenos diferentes (diacuerpos biespecíficos). Dichos anticuerpos biespecíficos permiten, por ejemplo, la captación de nuevas funciones efectoras (tales como las células T citotóxicas) en las células diana, que las convierte en muy útiles para aplicaciones en medicina.

15 Además, se han desarrollado formatos de anticuerpos que comprenden cuatro dominios variables de cadenas pesadas y cuatro dominios variables de cadenas ligeras. Entre los ejemplos de ellos se incluyen los anticuerpos biespecíficos tetravalentes (TandAbs y Flexicuerpos, Affirmed Therapeutics AG, Heidelberg, Alemania). En contraste con un diacuerpo biespecífico, un TandAb biespecífico es un homodímero que consiste en un único polipéptido. Debido a las dos cadenas diferentes, un diacuerpo puede construir tres dímeros diferentes, de entre los cuales sólo uno es funcional. Por lo tanto, resulta más sencillo y económico producir y purificar este producto homogéneo. Además, el TandAb habitualmente muestra mejores propiedades de unión (que presentan dos veces el número de sitios de unión) y una estabilidad in vivo incrementada. Los flexicuerpos son una combinación de scFv con un motivo multímero de diacuerpo que resulta en una molécula multivalente con un elevado grado de flexibilidad para la unión de dos moléculas que se encuentran bastante distantes una de otra sobre la superficie celular. En el caso de que se encuentren presentes más de dos dominios de unión a antígeno funcionales y en el caso de que presenten especificidad para antígenos diferentes, el anticuerpo es multiespecífico.

20 En resumen, entre los tipos de inmunoglobulina específicos que representan anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos se incluyen, aunque sin limitación, el anticuerpo siguiente: un Fab (fragmento monovalente con dominio ligero variable (VL), pesado variable (VH), ligera constante (CL) y constante pesada 1 (CH1)), un F(ab')<sub>2</sub> (fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro o alternativamente en la región bisagra), un Fv (dominios VL y VH), un scFv (un Fv de cadena sencilla, en el que VL y VH se unen mediante un conector, por ejemplo un conector peptídico), una molécula de anticuerpo biespecífico (una molécula de anticuerpo con especificidad tal como se indica en la presente memoria unida a una segunda fracción funcional con especificidad de unión diferente a la del anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, otro péptido o proteína, tal como anticuerpo o ligando de receptor), un dímero de Fv de cadena sencilla biespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un minicuerpo (un scFv unido a CH<sub>3</sub>).

25 Determinadas moléculas de anticuerpo o partes funcionalmente activas de las mismas, incluyendo, aunque sin limitación, Fv, scFv, moléculas de diacuerpo o anticuerpo de dominio (Domantis) pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro para unir los dominios VH y VL. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos utilizando tecnologías convencionales, entre los métodos específicos de las cuales se incluyen la producción química o a partir de hibridomas híbridos) y otras tecnologías, incluyendo, aunque sin limitación, la tecnología BiTETM (moléculas que presentan regiones de unión a antígeno de diferente especificidad con un conector peptídico) y la ingeniería de botón-en-ochal.

30 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una molécula de anticuerpo o parte funcionalmente activa de la misma puede ser un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub>, un Fv, un Fv unido mediante disulfuro, un scFv, un (scFv)<sub>2</sub>, un anticuerpo bivalente, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un minicuerpo.

35 En otra realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos mono-específicos que son idénticos debido a que son producidos por un tipo de célula inmunológica la totalidad de la cual son clones de una única célula parental. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que se fusiona por lo menos una región de una inmunoglobulina de una especie con otra región de una inmunoglobulina de otra especie mediante ingeniería genética con el fin de reducir su inmunogenicidad. Por ejemplo, las regiones VL y VH murinas pueden fusionarse con la parte restante de una inmunoglobulina humana. Un tipo particular de anticuerpos quiméricos son los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados se producen uniendo el ADN que codifica los RDC de un anticuerpo no humano a ADN productor de anticuerpo humano. El constructo de ADN resultante seguidamente puede utilizarse para expresar y producir anticuerpos que habitualmente no son tan inmunogénicos como el anticuerpo parenteral no humano o como un anticuerpo quimérico, ya que meramente los RDC son no humanos.

40 En una realización preferente de la presente invención, una molécula de anticuerpo o parte funcionalmente activa del

mismo utilizada en un método de la invención comprende un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado de entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana.

Tal como se ha detallado anteriormente en el contexto del anticuerpo de la presente invención, cada cadena pesada de un anticuerpo natural presenta dos regiones: la región constante y la región variable. Existen cinco tipos de cadena pesada de inmunoglobulina de mamífero:  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\epsilon$ , que definen las clases de inmunoglobulina IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente.

Existen cuatro subclases de IgG (IgG1, 2, 3 y 4) en el ser humano, denominadas en orden de abundancia en suero (siendo IgG1 el más abundante). Aunque existe una similitud de aproximadamente 95% entre sus regiones Fc de las subclases de IgG, la estructura de las regiones bisagra son relativamente diferentes. Dicha región, entre los brazos de Fab (por sus siglas en inglés, fragmento de unión de antígeno, «Fragment Antigen Binding») y los dos dominios carboxi-terminales CH2 y CH3 de ambas cadenas pesadas determina la flexibilidad de la molécula. El segmento de bisagra superior (hacia el extremo amino-terminal) permite una variabilidad del ángulo entre los brazos de Fab (flexibilidad Fab-Fab), así como flexibilidad rotacional de cada Fab individual. La flexibilidad de la región de bisagra inferior (hacia el extremo carboxi-terminal) determina directamente la posición de los brazos de Fab respecto a la región Fc (flexibilidad Fab-Fc). La flexibilidad Fab-Fab y Fab-Fc dependiente de la bisagra puede resultar importante en la inducción de funciones efectoras adicionales, tales como la activación del complemento y la unión de receptor de Fc. De acuerdo con lo anterior, la estructura de las regiones bisagra proporciona a cada una de las cuatro clases de IgG su perfil biológico único.

La longitud y flexibilidad de la región bisagra varía entre las subclases de IgG. La región bisagra de IgG1 comprende los aminoácidos 216 a 2231 y debido a que libremente flexible, los fragmentos Fab pueden rotar en torno a sus ejes de simetría y moverse dentro de una esfera centrada en el primero de dos puentes disulfuro entre cadenas pesadas. IgG2 presenta una bisagra más corta que IgG1, con 12 residuos aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. La región bisagra de IgG2 no presenta residuo de glicina, es relativamente corto y contiene una doble hélice poli-prolina rígida estabilizada por puentes disulfuro inter-cadenas pesadas adicionales. Estas propiedades restringen la flexibilidad de la molécula de IgG2. IgG3 difiere de las otras subclases por su región bisagra extendida única (aproximadamente cuatro veces más larga que la bisagra de IgG1), que contiene 62 aminoácidos (incluyendo 21 prolina y 11 cisteínas), formando una doble hélice poli-prolina inflexible. En IgG3, los fragmentos Fab se encuentran relativamente distantes del fragmento Fc, proporcionando a la molécula una mayor flexibilidad. La bisagra alargada en IgG3 también es responsable de su peso molecular más elevado en comparación con las otras subclases. La región bisagra de IgG4 es más corta que la de IgG1 y su flexibilidad es intermedia entre la de IgG1 y la de IgG2.

Utilizando los métodos de la invención, puede detectarse la cantidad total y/o la concentración de una amplia diversidad de analitos. Por ejemplo, el analito puede ser cualquier compuesto químico. Tal como se ha explicado anteriormente, los métodos de la invención resultan en particular útiles para detectar un analito que es la diana de un anticuerpo terapéuticamente activo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o receptor o fragmento de receptor, y en el que dicho anticuerpo terapéuticamente activo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o receptor o fragmento de receptor representa la molécula de unión de la invención. Dicha diana puede ser una hormona, péptido o proteína, una molécula circulante en la sangre de un animal o ser humano, o un biomarcador, en particular un marcador tumoral. Por lo tanto, en una realización preferente adicional, el analito es un compuesto químico, preferentemente una hormona, péptido o proteína, una molécula circulante en la sangre de un animal o ser humano, o un biomarcador, en particular un marcador tumoral.

En una realización también preferente, el analito es una proteína.

Tal como se ha dado a conocer anteriormente, en una realización preferente de la presente invención, la detección del complejo de molécula de detección-analito se lleva a cabo en un ensayo no competitivo, en particular en un ensayo de tipo sándwich, especialmente en el que el ensayo de tipo sándwich utiliza una molécula de captura capaz de unirse al analito, y en el que:

- la molécula de captura porta medios para la inmovilización, y
- la molécula de detección y la molécula de captura se unen a epítomos no solapantes diferentes en el analito.

En una realización preferente todavía adicional, la molécula de detección porta medios para el marcaje detectable con un marcaje detectable, en particular medios para la detección directa o indirecta.

El término "marcaje detectable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal mediante detección directa o indirecta. De esta manera, el marcaje detectable puede detectarse directa o indirectamente. Para la detección directa, el marcaje adecuado para la utilización en la presente invención puede seleccionarse de entre cualesquiera grupos marcadores detectables conocidos, tales como, cromógenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, pigmentos, pigmentos

fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), partículas coloidales metálicas y no metálicas y partículas de látex polimérico orgánico. Son otros ejemplos de marcajes detectables, complejos de metal luminiscentes, tales como complejos de rutenio o de europio, por ejemplo tales como los utilizados para ECLIA; enzimas, por ejemplo tales como los utilizados para ELISA, e isótopos radioactivos, por ejemplo tales como los utilizados para RIA.

Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que la molécula de detección, por ejemplo un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo, se marque con una primera pareja de una pareja de unión bioafín. Son ejemplos de parejas de unión adecuadas 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. Los elementos de la primera pareja de unión preferentes comprenden hapteno, antígeno y hormona. También resultan preferentes haptenos como la digoxina y la biotina y los análogos de los mismos. La segunda pareja de dicha pareja de unión, por ejemplo un anticuerpo, estreptavidina, etc., habitualmente se marca para permitir la detección directa, por ejemplo con los marcajes detectables indicados anteriormente.

Para un ensayo no competitivo o ensayo de tipo sándwich, resultan necesarios dos anticuerpos diferentes o fragmentos funcionalmente activos que se unen al mismo antígeno y que no interfieren uno con otro al unirse al antígeno. Los ensayos no competitivos o ensayos de tipo sándwich resultan ventajosos en comparación con los ensayos competitivos debido a su sensibilidad más elevada. En el caso de un ensayo de tipo sándwich, uno de los anticuerpos, en este caso la molécula de captura puede inmovilizarse en un soporte. Tras la adición de una solución de sonda, el antígeno en la misma (es decir, el analito según la invención) se une a la molécula de captura y la molécula de detección puede unirse a un sitio de unión diferente del analito (ver la figura 1B). Para la detección del complejo de molécula de detección-analito, se utiliza la molécula de detección, tal como se ha explicado anteriormente en detalle. Debido a que tanto la molécula de detección como la molécula de captura deben unirse al analito en la presente realización de la invención, ambas moléculas se unen a epítomos no solapantes diferentes en el analito en la presente realización. Un epítomo, también conocido como determinante antigénico, es la parte de un antígeno que es reconocida por las moléculas de unión, en particular anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos. La parte de un anticuerpo que reconoce el epítomo también se denomina paratopo. Los epítomos de los antígenos de proteínas se dividen en dos categorías: epítomos conformacionales y epítomos lineales, basándose en su estructura e interacción con el paratopo. Los métodos para determinar los epítomos son conocidos de la técnica y comprenden, por ejemplo, el mapeado de epítomos, por ejemplo utilizando micromatrices de proteínas y con las técnicas ELISPOT o ELISA. Los epítomos de las proteínas típicamente comprenden varios aminoácidos, en el caso de los epítomos lineales típicamente es un tramo de 5 a 15 aminoácidos. Con el fin de evitar impedimentos estéricos, por lo tanto resulta preferente que los epítomos de la molécula de captura y la molécula de detección sean no solapantes, es decir, completamente separados con respecto a la estructura primaria en el caso de los epítomos lineales.

En una realización preferente, el ensayo de tipo sándwich es un inmunoensayo de tipo sándwich, en particular es un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Un inmunoensayo es un ensayo bioquímico que mide la presencia o la concentración de una macromolécula en una solución mediante la utilización de un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo. La molécula detectada por el inmunoensayo con frecuencia se denomina «analito» y es en muchos casos una proteína. Los inmunoensayos se presentan en muchos formatos y variaciones diferentes. Los inmunoensayos pueden ejecutarse en múltiples etapas, en la que los reactivos se añaden, se lavan o se separan en diferentes puntos del ensayo. Los ensayos multietapa con frecuencia se denominan inmunoensayos separativos o inmunoensayos heterogéneos. Algunos inmunoensayos pueden llevarse a cabo simplemente mediante la mezcla de los reactivos y la muestra y realizando una medición física. Dichos ensayos se denominan inmunoensayos homogéneos.

Con frecuencia se utiliza un calibrador en los inmunoensayos. Los calibradores son soluciones que es conocido que contienen el analito en cuestión y la concentración de dicho analito es generalmente conocida. La comparación de la respuesta de un ensayo en una muestra real con la respuesta del ensayo producida por los calibradores permite interpretar la intensidad de la señal en términos de la presencia o concentración del analito en la muestra.

Son ensayos de tipo sándwich adecuados aparte del ELISA, el inmunoensayo de (electro-)quimioluminiscencia, el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo de fluorescencia (FIA), el inmunoensayo enzimático de captura de micropartículas (MEIA), los inmunoensayos de fluorescencia en fase sólida (SPFIA), el inmunoensayo de concentración de partículas por fluorescencia (PCFIA), el ensayo nefelométrico y turbidimétrico con y sin potenciación con partículas de látex (LPIA). Además, el ensayo puede encontrarse en forma de tiras de ensayo.

Es conocido para el experto en la materia que el marcaje detectable y la molécula de captura, en caso aplicable, se seleccionarán según el ensayo no competitivo, en particular el ensayo de tipo sándwich, seleccionado, y viceversa.

En una realización preferente adicional, las proteínas en la muestra no se desnaturalizan antes o durante el método de la invención. Lo anterior garantiza que se conserven las propiedades de unión de las diversas moléculas de unión y la estructura tridimensional del analito utilizado en el método de la invención. En una realización preferente adicional, las proteínas en la muestra no se desnaturalizan irreversiblemente antes o durante el método de la invención. En el

caso de que se utilice una etapa de desnaturalización reversible antes de la primera etapa del método de la invención, la desnaturalización debería revertirse antes del método, con el fin de garantizar de que los sucesos de unión puedan producirse correctamente. En una realización preferente adicional, el analito es una proteína que no se desnaturaliza antes o durante el método de la invención. En una realización preferente adicional, el analito es una proteína que no se desnaturaliza irreversiblemente antes o durante el método de la invención. En una realización preferente adicional, la molécula de detección y/o la molécula atrapadora y/o la molécula de unión y/o la molécula de captura, en caso aplicable, son proteínas que no se desnaturalizan antes o durante el método de la invención.

La ventaja de los métodos de la invención es que la cantidad total de analito puede determinarse en presencia de la molécula de unión que es capaz de unión al analito. Por lo tanto, no resulta necesario llevar a cabo una etapa de lavado, en particular con el fin de eliminar la molécula de unión. Por lo tanto, en una realización preferente, no se lleva a cabo ninguna etapa de lavado después de la etapa (i) de la invención.

Alternativamente, puede llevarse a cabo una etapa de lavado. Dicha etapa de lavado puede llevarse a cabo, por ejemplo en el caso de la realización preferente ilustrada en la figura 1, en la que el analito se inmoviliza mediante la unión a la molécula de captura. En dicha realización, el complejo de molécula de unión y molécula atrapadora puede eliminarse mediante lavado antes de la detección del complejo de molécula de detección-analito. Sin embargo, se entiende que también resulta posible detectar el complejo de molécula de detección-analito sin una etapa de lavado previa en dicha realización. Dicha etapa de lavado, en caso de llevarse a cabo, puede llevarse a cabo tal como es conocido por el experto en la materia, en particular utilizando una solución tamponada, que preferentemente no perturbe los complejos formados en el método de la invención.

De esta manera, en una realización adicional, se lleva a cabo una etapa de lavado después de la etapa (i) de la invención. Preferentemente, no se lleva a cabo ninguna etapa de lavado después de la etapa (i) de la invención.

Los métodos de la invención pueden utilizarse para diversos tipos de muestras, preferentemente en los que la muestra es un líquido, en particular un líquido corporal. De esta manera, en una realización adicional de la presente invención, la muestra es un líquido, en particular un líquido acuoso, sangre o suero sanguíneo.

En una realización preferente adicional, la concentración del analito en la muestra, en particular sangre o suero sanguíneo, se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 pg/ml y 20 µg/ml, preferentemente entre 1 ng/ml y 10 µg/ml.

Tal como se ha dado a conocer anteriormente, la molécula de unión es en una realización preferente un agente terapéutico y/o diagnóstico, en particular un agente terapéutico. Dichos agentes terapéuticos y/o diagnósticos con frecuencia son caros y, además, la eficacia y farmacocinética de dichos agentes terapéuticos y/o diagnósticos puede diferir considerablemente de sujeto a sujeto. Por lo tanto, resultaría útil determinar el analito en muestras de un sujeto, determinando de esta manera el éxito terapéutico y/o la progresión de la enfermedad, así como la ausencia, la presencia y/o la severidad de una enfermedad de un paciente.

Por lo tanto, en una realización preferente adicional, la molécula de unión, en particular un agente terapéutico o diagnóstico, ha sido administrado en el sujeto del que se ha obtenido la muestra. La administración de la molécula de unión depende de la naturaleza de la molécula de unión y el médico adaptará el modo, régimen de administración y dosis de administración de acuerdo con ella. Típicamente, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz en el caso de una molécula de unión terapéuticamente activa. De esta manera, el método puede utilizarse para determinar o seguir la cantidad o concentración del agente terapéutico o diagnóstico en el sujeto.

Alternativamente, la molécula de unión no es un agente terapéutico sino, por ejemplo, un agente diagnóstico o una pareja de unión natural del analito. Preferentemente, el analito es un biomarcador. También en esta situación, la determinación de la cantidad total y/o la concentración del analito permite el seguimiento de la enfermedad y la sensibilidad de la enfermedad al tratamiento.

Además, con frecuencia también resulta ventajoso no sólo determinar la cantidad total de analito sino, además, determinar la cantidad de analito libre, analito unido y/o la proporción de analito unido vs. libre y/o analito total vs. analito unido y/o analito total. Lo anterior resulta adicionalmente útil para el seguimiento de la enfermedad y la sensibilidad de la enfermedad al tratamiento.

En particular, con frecuencia resulta importante determinar la cantidad de analito unida a la molécula de unión y/o para determinar la proporción (o concentración, respectivamente) de analito unido a la molécula de unión vs. la cantidad (o concentración, respectivamente) de analito total o analito libre. Dicha cantidad o proporción resulta importante para el seguimiento de la terapia de una enfermedad, en particular la terapia de una enfermedad con la molécula de unión que es un agente terapéutico.

Por lo tanto, en una realización preferente todavía adicional, el método de la invención comprende:

- i) llevar a cabo la etapa (i) tal como se ha indicado anteriormente,

- ii) llevar a cabo la etapa (ii) tal como se ha indicado anteriormente y
- iii) determinar adicionalmente, en ausencia de molécula atrapadora, la cantidad y/o concentración de analito libre en la muestra, que no se une a la molécula de unión, y determinar opcionalmente la cantidad y/o concentración y/o proporción de analito unido a la molécula de unión en la muestra.

5 En el caso de una molécula de unión que es un agente terapéutico, el analito preferentemente representa la diana de tratamiento con la molécula de unión; alternativamente, el analito es un biomarcador para una determinada enfermedad. Por lo tanto, una cantidad y/o concentración reducidas del analito puede indicar que la enfermedad no se encuentra presente ya o que es menos severa. De manera similar, una cantidad y/o concentración incrementadas del analito puede indicar, por lo tanto, que la enfermedad se encuentra presente o que es más severa. En particular, la presencia o la ausencia de una enfermedad de un paciente puede determinarse mediante la determinación de si la cantidad total y/o la concentración del analito es superior o inferior a un valor de corte determinado para un analito determinado en una enfermedad determinada. Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, la cantidad total y/o la concentración del analito es indicativa de la ausencia, presencia y/o severidad de una enfermedad de un paciente. Por lo tanto, en una realización preferente adicional de la presente invención, la cantidad total y/o la concentración del analito es indicativa de la respuesta terapéutica de un paciente a un tratamiento, en particular en el que el paciente ha sido tratado con la molécula de unión.

20 En una realización preferente todavía adicional de la presente invención, la cantidad y/o concentración y/o proporción del analito unido a la molécula de unión en la muestra es indicativa de la ausencia, presencia y/o severidad de una enfermedad de un paciente, y/o de la respuesta terapéutica de un paciente al tratamiento, en particular en el que el paciente ha sido tratado con la molécula de unión.

25 Mediante la utilización de los métodos de la invención, puede realizarse un seguimiento de una terapia en particular con una molécula de unión que es un agente terapéutico, permitiendo de esta manera la adaptación de la terapia, en caso necesario. Lo anterior resulta útil en particular en enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, en una realización preferente adicional de la presente invención, el método se utiliza para el seguimiento de la terapia, en particular en la terapia del cáncer. En una realización, la terapia, en particular la terapia del cáncer, se lleva a cabo con la molécula de unión como agente terapéutico y/o utilizando terapias conocidas de la técnica. En el caso del cáncer, las terapias conocidas comprenden el tratamiento quimioterapéutico, en particular el tratamiento con compuestos citotóxicos como taxanos y/o la radioterapia.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit o composición adecuado para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en una muestra, comprendiendo además dicha muestra una molécula de unión capaz de unirse al analito, que comprende:

- a) una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito, y
- b) una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión, y
- c) el analito, y
- 40 d) la molécula de unión capaz de unión al analito, y
- e) opcionalmente una molécula de captura porta medios para la inmovilización del analito, en el que la molécula de detección es diferente de la molécula de unión y en el que el analito es diferente de la molécula atrapadora y
- 45 en el que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión, y en el que la molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor.

50 Dicho kit puede utilizarse en un método de la invención descrita anteriormente. En una realización preferente, el kit o composición de la invención resulta adecuado para la utilización en cualquiera de los métodos de la invención. Además, todas las realizaciones dadas a conocer como realizaciones preferentes de métodos de la invención también resultan de aplicación a los kits de la invención.

55 De esta manera, en todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un kit o composición de la invención adecuado para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en una muestra, en la que la muestra comprende además una molécula de unión capaz de unión al analito, en cualquiera de los métodos de la invención. Según la presente invención, el kit o composición comprende:

- a) una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito, y
- 60 b) una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión, y
- c) opcionalmente el analito, y
- d) opcionalmente la molécula de unión capaz de unión al analito, y
- e) opcionalmente una molécula de captura porta medios para la inmovilización del analito,

65 en el que la molécula de detección es diferente de la molécula de unión y en el que el analito es diferente de la molécula atrapadora y

en el que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión, y en el que la molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor.

En particular, la cantidad total de analito puede determinarse, tal como se ha indicado anteriormente. En una realización preferente, el analito es diferente de la molécula atrapadora. En una realización preferente adicional, la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión. Por lo tanto, en todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un kit o composición de la invención para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en una muestra, preferentemente en la que el analito es diferente de la molécula atrapadora y/o en la que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión. Preferentemente, el analito es un biomarcador y/o la muestra es sangre o suero sanguíneo.

Además, la respuesta terapéutica de un paciente al tratamiento, en particular en el que el paciente es tratado con la molécula de unión, puede determinarse utilizando los kits de la invención, mediante la utilización de los mismos en métodos de la invención. Por lo tanto, en todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un kit o composición de la invención para la determinación de la respuesta terapéutica de un paciente a un tratamiento, en particular en la que el paciente es tratado con la molécula de unión.

## FIGURA

Figura 1: representa una ilustración esquemática de un método preferente de la invención. A) Dicha figura ilustra la situación en la que la molécula de unión se une al analito, que se encuentra inmovilizado mediante la molécula de captura. La molécula de detección no puede unirse al analito. B) En esta situación, la molécula atrapadora se une a la molécula de unión, que de esta manera es liberada del analito. La molécula de detección ahora puede unirse al analito inmovilizado. Lo anterior permite la determinación de esencialmente la cantidad total o la concentración del analito en cuestión, aunque la molécula de unión se encuentre presente en la muestra.

Figura 2: representa los resultados según el Ejemplo 4 (detección de TWEAK total). Matriz artificial (EKM): 5 ng/ml de TWEAK recombinante (5 ng/ml de AG); 5 ng/ml de TWEAK recombinante con adición de 515 µg/ml del anticuerpo terapéutico (5 ng/ml de AG + 515 µg/ml de fármaco). Se muestran los resultados para muestras sin anticuerpo antiidiotípico (sin antic.) y con un amplio exceso de anticuerpo antiidiotípico (+M-2.38.37).

Figura 3: representa los resultados según el Ejemplo 4 (detección de TWEAK total). Matriz artificial (EKM): muestras de suero (muestras 7 y 8, respectivamente); muestras de suero que contienen el anticuerpo terapéutico (muestra 7 + 515 µg/ml de fármaco y muestra 8 + 515 µg/ml de fármaco, respectivamente). Se muestran los resultados para muestras sin anticuerpo antiidiotípico (sin antic.) y con un amplio exceso de anticuerpo antiidiotípico (+M-2.38.37).

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Método de la invención en el que la molécula de unión es un anticuerpo terapéuticamente activo y la molécula atrapadora es un anticuerpo antiidiotipo (antic. anti-id)

Una concentración máxima común de anticuerpo (IgG, 150 kDa) en el ensayo de formulación de viscosidad es de 150 mg/ml=1 mM de anticuerpo. Por ejemplo, la concentración de herceptina estable (como anticuerpo terapéuticamente activo) en suero de paciente a una dosis semanal de herceptina de 500 mg de herceptina es de 377 µg/ml=2,6 µM de herceptina y Pertuzumab 200 µg/ml=1,4 µM (ambos anticuerpos se unen a HER2/neu, que representa el analito según la invención). La diferencia de concentración entre una dosis máxima y un valor común de concentración en suero puede considerarse como la ventana de concentración de aplicación de un antic. Anti-id con el fin de determinar el analito total en una muestra in vitro (en el presente ejemplo, el analito es HER2). Una concentración de antic. anti-id de 1 mM es una concentración de aplicación posible muy elevada, pero por la relación eficacia-coste, resultan preferentes concentraciones de anticuerpo anti-id mucho más bajas. Además, la concentración de antic. anti-id debe ser suficientemente elevada para desplazar la reacción en el equilibrio durante el tiempo típico de incubación en las mediciones de electroquimioluminiscencia, en particular utilizando Elecsys® (Roche).

$$\text{Estimación de tiempo hasta el equilibrio (T): } T = 3,5 / (ka * c) + kd$$

Un tiempo de incubación de 9 min en el sistema Elecsys® se considera un factor no limitativo para una unión de anticuerpo anti-id con una afinidad de 1,3 nM, un perfil común de tasa cinética y una concentración de 1 µM.

Los ensayos cinéticos de competición, preferentemente mediante resonancia del plasmón superficial, en particular

utilizando el sistema Biacore®, habitualmente se controlan con un exceso molar de 3 a 5 veces del competidor respectivo respecto a la diana. El anticuerpo anti-id no debería aplicarse a una concentración inferior de [anticuerpo terapéuticamente activo] \* 3 = [antic. anti-id]. En el caso del bloqueo de la herceptina sérica con un anticuerpo anti-id, la concentración del antic. Anti-id debería ser de 5 \* 2,6 μM = 13 μM (2 mg/ml) de antic. anti-id, que es factible y satisface los requisitos de tiempo hasta el equilibrio.

Ejemplo 2: Aplicaciones que también resultan útiles para moléculas de unión de afinidad extremadamente elevada

Un algoritmo robusto para la concentración de aplicación de las moléculas atrapadoras podría complementarse con el cociente de afinidades:

Ejemplo A

$$(KD_{\text{(molécula atrapadora)}} / KD_{\text{(molécula de unión)}}) * 5 \mu\text{M} = [\text{Antic. anti-id.}]$$

$$(KD_{\text{anti-Herceptina}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{Herceptina}} 0,1 \text{ nM}) * 5 \mu\text{M} = 50 \mu\text{M} = 7 \text{ mg/ml antic. anti-id.}$$

Ejemplo B, adición de la concentración de la molécula de unión sérica

$$(KD_{\text{(molécula atrapadora)}} / KD_{\text{(molécula de unión)}}) * [\text{molécula de unión sérica}] * 3 = [\text{Antic. anti-id.}]$$

$$(KD_{\text{anti-Herceptina}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{Herceptina}} 0,1 \text{ nM}) * 2,6 \mu\text{M}_{\text{Herceptina sérica}} * 3 = 78 \mu\text{M} = 11 \text{ mg/ml}$$

Antic. anti-id

Un factor de exceso molar de 3 veces del antic. anti-id frente a la molécula de unión resulta suficiente porque la concentración de antic. anti-id se incrementa por la multiplicación por el cociente de afinidad.

Ejemplo C

$$(KD_{\text{anti-AbxY}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{AbxY}} 0.01 \text{ nM}) * 2,6 \mu\text{M}_{\text{Abxu sérico}} * 3 = 780 \mu\text{M} = 111 \text{ mg/ml}$$

El Ejemplo C resulta factible; sin embargo, no presenta una buena relación coste/eficacia. Resulta preferente una molécula atrapadora de afinidad más elevada.

Otro aspecto muy importante son las valencias de unión de las moléculas de unión, en particular los anticuerpos. En la unión a analitos pequeños, una molécula de unión que es un anticuerpo típicamente muestra una valencia de unión de MR=2, mientras que por motivos estéricos, la molécula atrapadora que es un anticuerpo antiidiotipo mayoritariamente muestra una valencia de unión de MR=1 e inferior. En este caso, el cociente de molaridades funcionales preferentemente debe ser considerado en el cálculo.

Ejemplo D

$$(MR_{\text{(molécula de unión)}} / MR_{\text{(molécula atrapadora)}}) * (KD_{\text{(antic. anti-id)}} / KD_{\text{(molécula de unión)}}) * [\text{molécula de unión sérica}] * 3 = [\text{Antic. anti-id}]$$

$$(MR_{\text{(molécula de unión)}} 2 / MR_{\text{(antic. anti-id)}} 1) * (KD_{\text{(antic. anti-id)}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{(molécula de unión)}} 0,1 \text{ nM}) * [2,6 \mu\text{M}] * 3 = 156 \mu\text{M}$$

Se requieren 22 mg/ml de molécula atrapadora que es anticuerpo anti-id.

El Ejemplo D representa una realización preferente según la invención.

Ejemplo 3A: Generación de anticuerpos monoclonales

Para la generación de anticuerpos contra TWEAK, se inmunizaron ratones Balb/C, NMRI y SJL con proteína TWEAK derivada de E. coli recombinantes. Todos los ratones se sometieron a 3 inmunizaciones en los puntos temporales de 0, 6 y 10 semanas después del inicio de la campaña de inmunización. En cada punto temporal cada ratón fue inmunizado con 100 μg de inmunógeno disueltos en 100 μl de PBS. Para la primera inmunización, el inmunógeno se mezcló con 100 μl de CFA. Para la segunda y tercera inmunizaciones, el inmunógeno se mezcló con 100 μl de IFA. La primera y tercera inmunizaciones se realizaron por vía intraperitoneal y la segunda inmunización, por vía



subcutánea. 2 y 3 días antes de la preparación de los esplenocitos para el desarrollo de anticuerpos utilizando la tecnología del hibridoma, los ratones fueron sometidos a inmunizaciones de refuerzo intravenosas con 12,5 µg de inmunógeno en 100 µl de PBS y sin adyuvante.

5 Para la determinación de los títulos séricos frente al inmunógeno respectivo, se recolectó una cantidad reducida de suero de cada ratón en la semana 11 después del inicio de la inmunización. Para el ELISA, se inmovilizó TWEAK recombinante sobre la superficie de la placa. Para la inmovilización, se utilizó el inmunógeno a una concentración de 0,25 µg/ml. El suero de cada ratón se diluyó en PBS con BSA al 1% y se añadieron las diluciones a las placas. Los sueros se sometieron a ensayo a las diluciones 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900, 1:218700 y 1:656100.  
10 El anticuerpo unido se detectó con F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-Fcγ de ratón marcado con HRP (Dianova) y ABTS (Roche) como sustrato.

En la Tabla 1, se muestran los títulos séricos de los ratones inmunizados. El analito, TWEAK humano recombinante derivado de E. coli, se inmovilizó a una concentración de 250 ng/ml. Se midieron los títulos séricos mediante diluciones en serie de los sueros de ratones individuales en placas de 96 pocillos.  
15

Tabla 1:

Cepa de ratón	Número de ratón	Título sérico
Balb/c	1831/1	48788
Balb/c	1831/2	61589
Balb/c	1831/3	33658
Balb/c	1831/4	39573
Balb/c	1831/5	72775
NMRI	1832/1	3460
NMRI	1832/2	51925
NMRI	1832/3	64945
NMRI	1832/4	24769
NMRI	1832/5	3664
SJL	1833/1	25774
SJL	1833/2	30777
SJL	1833/3	23692
SJL	1833/4	55638
SJL	1833/5	49018

20 Los anticuerpos fueron desarrollados con tecnología de hibridoma mediante la fusión de células B primarias con células de mieloma P3X63Ag8.653. 2 días después de la inmunización de refuerzo final, los ratones inmunizados fueron sacrificados y se prepararon poblaciones de células de bazo (esplenocitos). Los esplenocitos se fusionaron con P3X63Ag8.653 mediante la utilización de fusión con PEG. El cultivo por lotes celular procedente de la fusión se incubó durante la noche a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, el lote celular, que contenía las células fusionadas, se centrifugó durante 10 min a 400 g. Después, las células se suspendieron en medio de selección de hibridoma complementado con 0,1x azaserina-hipoxantina (Sigma) y se sembraron a una densidad de 2,5x10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las placas se cultivaron durante por lo menos 1 semana a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Tres días antes del análisis de ELISA, se cambió el medio de selección.  
25

30 Se sometieron a ensayo sobrenadantes de cultivo primario en ELISA frente a antígeno TWEAK recombinante inmovilizado sobre la superficie de la placa. Se inmovilizó TWEAK recombinante a una concentración de 0,25 µg/ml. Se añadió sobrenadante del hibridoma a las placas y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó con F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-Fcγ de ratón marcado con HRP (Dianova) y se utilizó ABTS (Roche) como sustrato de HRP.  
35

La Tabla 2 muestra la evaluación de los clones seleccionados mediante ELISA. La unión de los clones seleccionados frente a TWEAK humano recombinante se sometió a ensayo en ELISA. El analito se inmovilizó sobre la superficie de la placa a una concentración de 0,25 µg/ml. Todos los clones mostraban unión a TWEAK humano.  
40

Tabla 2:

número de clon	ELISA de TWEAK [DO]
10.180.3	1,39
10.43.14	1,19
10.156.32	1,50
10.209.34	1,14
10.250.35	1,28
10.10.36	1,08
10.217.66	1,31

10.61.71	1,08
10.230.79	1,04
11.226.1	1,429

### Ejemplo 3B: Generación de anticuerpos monoclonales antiidiotípicos

#### a) Inmunización de ratones

5 Se inmunizaron ratones NMRI principalmente por vía intraperitoneal con 100 µg de F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo monoclonal humanizado anti-TWEAK formulado con CFA (por sus siglas en inglés, adyuvante completo de Freund). Se llevaron a cabo dos etapas adicionales de inmunización intraperitoneal seguidas, tras 6 y 10 semanas, de la aplicación de 100 µg del F(ab')<sub>2</sub> anteriormente indicado por ratón mezclado con IFA (por sus siglas en inglés, adyuvante incompleto de Freund). A continuación, los ratones recibieron un refuerzo mediante la administración i.v. de 25 µg de F(ab')<sub>2</sub> (en PBS) 3 días antes de sacrificar los animales y se aislaron las células de bazo y se utilizaron para la fusión.

#### b) Fusión y clonación

15 La fusión de las células de bazo con las células de mieloma se llevó a cabo mediante procedimientos estándares utilizando polietilenglicol. Brevemente, se mezclaron 1x10<sup>8</sup> esplenocitos con aprox. 2X10<sup>7</sup> células de mieloma P3x63-Ag8.653, ATCC n° CRL1580) en RPMI-1640 y se centrifugaron (10 min a 510 x g y 4°C). Las células se lavaron una vez con RPMI-1640 y se centrifugaron nuevamente. Después, se añadió 1 ml de PEG (polietilenglicol, peso molecular: 4.000 g/mol); la mezcla se llevó a cabo mediante el pipeteado. Tras 1 min en un baño de agua a 37°C, se añadieron 20 5 ml de RPMI-1640 gota a gota, se mezcló la suspensión, se enrasó a 30 ml con RPMI-1640 y se centrifugó. Las células se resuspendieron en medio de selección (RPMI-1640 complementado con FCS al 10%, 100 U/ml de IL-6, L-glutamina 2 mM, NEAA 100 µM, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 24 µM, hipoxantina 100 µM y 1 µg/ml de azaserina) y posteriormente se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Tras aproximadamente 10 días, los cultivos primarios se sometieron a ensayo para la producción de anticuerpos específicos (tal como se indica 25 posteriormente).

Se clonaron cultivos primarios que mostraban unión al F(ab')<sub>2</sub> humanizado anteriormente indicado y ninguna reactividad cruzada con IgG humana normal se clonaron mediante separación de células individuales utilizando un citómetro de flujo (FACSAria, BD Biosciences). Se cultivaron clones celulares en RPMI-1640 complementado con FCS al 10%, 50 U/ml de IL-6, L-glutamina 2 mM, NEAA 100 µM, piruvato sódico 1 mM y 2-mercaptoetanol 24 µM. Las líneas celulares de hibridoma monoclonales establecidas se sometieron a ensayo nuevamente para especificidad tal como se indica posteriormente.

35 Para la conservación, las líneas celulares de hibridoma se congelaron en medio de congelación (92,5% de FCS, 7,5% de DMSO) a -80°C utilizando un recipiente congelador (tasa de congelación: -1°C/minuto) (Mr. Frosty, Nalgene) y posteriormente se almacenó en nitrógeno líquido.

### Ejemplo 4: Ensayos de cribado para la detección de anticuerpos antiidiotípicos

#### a) Cribado primario para anticuerpos de unión preferente a anticuerpo monoclonal (mAb) anti-TWEAK humanizado

40 Para la determinación de la especificidad de los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma, se recubrieron MTP (placas de microtitulación) prerrecubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat, Bernried, Alemania), con 100 µl/pocillo del fragmento F(ab')<sub>2</sub> biotinilado del mAb anti-TWEAK humanizado (250 ng/ml) o IgG humana policlonal biotinilada (2 µg/ml). Los anticuerpos se diluyeron en PBS/BSA II al 1,0% (Roche). Para el recubrimiento eficiente, las placas se incubaron durante 1 h a TA con la solución de anticuerpo respectiva. A continuación, las placas se lavaron con NaCl al 0,9%/Tween-20® al 0,05%. En la etapa siguiente, se añadieron 100 µl/pocillo de la solución de anticuerpo que debía someterse a ensayo (sobrenadantes de cultivo) y se incubaron durante 1 h a TA. Tras el lavado con NaCl al 0,9%/Tween-20® al 0,05%, se añadieron 100 µl/pocillo de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> marcado con peroxidasa de rábano picante de un anticuerpo policlonal de oveja anti-Fcy de ratón (100 ng/ml) para la detección de anticuerpo de muestra unido. Tras la incubación durante 1 h a TA, las placas se lavaron tal como se ha indicado anteriormente. Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de ABTS® (Roche). Tras 30 min de incubación a TA, se midió la extinción (DO) a 405 nm y a 492 nm [405/492].

55 Este cribado condujo a la selección de anticuerpos de unión a anticuerpos monoclonales anti-TWEAK humanizados, así como que sólo mostraban una reactividad cruzada baja o nula con IgG humana. Dicha selección de anticuerpos se sometió además al ensayo b).

#### b) Selección de anticuerpos con la reactividad cruzada más baja con IgG humana

60 Con el fin de identificar de entre los candidatos del cribado b) aquellos que mostraban la reactividad cruzada más baja con IgG humana, se llevó a cabo el ensayo siguiente. Las MTP prerrecubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat) se recubrieron con 100 µl/pocillo del fragmento F(ab')<sub>2</sub> biotinilado del mAb anti-TWEAK humanizado (250

ng/ml en PBS/BSA II al 1,0%) tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, las placas se lavaron con NaCl al 0,9%/Tween-20® al 0,05%. En la etapa siguiente, se añadió a los pocillos una mezcla de 50 µl del anticuerpo candidato (sobrenadante de cultivo) y 50 µl de IgG humana policlonal (a una concentración final de 40 mg/ml). En un experimento de control, se añadió a los pocillos una mezcla de 50 µl del anticuerpo candidato respectivo (sobrenadante de cultivo) y 50 µl de tampón. Las placas se incubaron durante 1 h a TA. Tras el lavado con NaCl al 0,9%/Tween-20® al 0,05%, se añadieron 100 µl/pocillo de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> marcado con peroxidasa de rábano picante de un anticuerpo policlonal de oveja anti-Fcγ de ratón (100 ng/ml) para la detección de anticuerpo de muestra unido. Tras la incubación durante 1 h a TA, las placas se lavaron tal como se ha indicado anteriormente. Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de ABTS® (Roche Diagnostics GmbH). Tras 30 min de incubación a TA, se midió la extinción (DO) a 405 nm y a 492 nm [405/492].

Los anticuerpos que mostraban la menor pérdida de señal del ensayo en presencia de IgG humana policlonal mostraban la reactividad cruzada más baja y se seleccionaron para la evaluación posterior.

### c) Análisis de interacciones

La cinética y la afinidad de la interacción de los diferentes mAb antiidiotípicos murinos con el anticuerpo anti-TWEAK humanizado, así como la reactividad cruzada con IgG humana policlonal normal se evaluó mediante análisis de Biacore. Brevemente, se utilizó un chip sensor CM5 (GE Healthcare) con un anticuerpo anti-Fcγ de ratón para capturar los mAb antiidiotípicos murinos. El fragmento Fab del anticuerpo anti-TWEAK humanizado se utilizó como analito a las concentraciones siguientes: 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,11 nM, 3,33 nM y 10 nM. Con el fin de evaluar la reactividad cruzada de los mAb antiidiotípicos con IgG humana normal, se utilizó como analito una solución 1.000 nM de IgG humana policlonal. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 37°C utilizando un sistema Biacore A100 (GE Healthcare); la asociación y la disociación se registraron durante 180 s o 300 s, respectivamente. Los anticuerpos con la afinidad más alta y sin reactividad cruzada detectable con IgG humana normal se seleccionaron para la utilización posterior.

Tabla 3:

Nº de clon de mAb anti-id	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	t <sub>1/2</sub> dis. [min]	K <sub>D</sub> (pM)	Reactividad cruzada con IgG humana
5.4.1	> 1,00E+06	3/18E-05.	363	< 32	no detectable
5.5.1	> 1,00E+06	2/44E-04.	47	< 244	no detectable
5.10.4	> 1,00E+06	1/41E-04.	82	< 141	no detectable
5.11.4	> 1,00E+06	2/44E-05.	474	< 24	no detectable
5.12.6	> 1,00E+06	3/18E-05.	364	< 32	no detectable
5.13.6	> 1,00E+06	3/05E-05.	379	< 30	no detectable
5.17.11	> 1,00E+06	1/63E-05.	709	< 16	no detectable
5.19.11	> 1,00E+06	1/49E-05.	777	< 15	no detectable
5.25.20	> 1,00E+06	1/90E-05.	609	< 19	no detectable
5.28.20	> 1,00E+06	1/96E-05.	589	< 20	no detectable
5.36.37	> 1,00E+06	3/18E-05.	364	< 32	no detectable
5.38.37	> 1,00E+06	3/79E-05.	305	< 38	no detectable

La Tabla 3 muestra la cinética y la afinidad de la interacción de los diferentes mAb antiidiotípicos murinos (nº de clon de mAb anti-id) con el anticuerpo humanizado anti-TWEAK, así como la reactividad cruzada con IgG humana policlonal normal (reactividad cruzada con IgG humana).

#### Ejemplo 5: Detección de TWEAK soluble (10.180.003-IgG-Bi/11.226.001-IgG-Ru)

Se desarrolló un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) para la medición específica de TWEAK en muestras de suero o plasma humano utilizando el analizador cobas® e411.

El inmunoensayo de TWEAK Cobas® es un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) que funciona a partir del principio del sándwich. El ensayo incluye dos anticuerpos: un anticuerpo monoclonal biotilado 10.180.003-IgG-Bi (anticuerpo de captura) y un anticuerpo monoclonal rutenilado anti-TWEAK 11.226.0001-IgG-Ru (anticuerpo de detección), que forman complejos de inmunoensayo de tipo sándwich con TWEAK en la muestra. A continuación, se unen los complejos a micropartículas de fase sólida recubiertas de estreptavidina. Las micropartículas se capturan magnéticamente sobre la superficie de un electrodo, y la aplicación de un voltaje en el electrodo induce una emisión quimioluminiscente que se mide con un fotomultiplicador, obteniendo las lecturas. Los resultados se determinan a partir de una curva de calibración específica del instrumento. Para la detección de TWEAK total, se utilizó un anticuerpo monoclonal antiidiotípico (MAK<ID<TWEAK>5.38.37-IgG). Dicho anticuerpo se incubó con la muestra en el analizador cobas® e411 antes de añadir anticuerpos monoclonales de tipo sándwich (10.180.003-IgG-Bi-11.226.001-IgG-Ru).

Se aplicó el ensayo tal como se ha indicado en el manual de funcionamiento del analizador Cobas® e411, dejando 36 minutos de incubación de 35 µl de reactivo 1 (R1) que contenía 35 mg/ml de MAK<ID<<TWEAK>5.38.37-IgG en

5 tampón de reacción para la detección de TWEAK total. Para la detección de TWEAK libre, se utilizó el mismo tampón R1 sin el anticuerpo monoclonal anti-ID MAK<ID<TWEAK>5.38.37-IgG. A continuación, la mezcla se incubó durante 9 minutos con 95 µl de reactivo 2 (R2) que contenía 0,68 µg/ml de 10.180.003-IgG-Bi biotinilado y 0,68 g/ml de 11.226.001-IgG-Ru rutenilado en el mismo tampón de reacción y 35 µl de una suspensión de micropartículas. Durante la incubación, se formó un sándwich anticuerpo-analito-anticuerpo que se unía a las micropartículas. Finalmente, las micropartículas se transfirieron a la cámara de detección del analizador cobas® e411 para la generación y lectura de las señales. Para la calibración, se preparó una serie de calibradores con diferentes concentraciones de TWEAK recombinante (PreproTech) (0 ng/ml, 0,037 ng/ml, 0,111 ng, 0,333 ng/ml, 1 ng/ml y 3 ng/ml) en matriz de calibración Tris/HCl 50 mM, L-Asn 25 mM, pH 7,5). Se calculó la ecuación de la curva de calibración mediante ajuste de curvas no lineal por mínimos cuadrados (RCM-Rodbard) y se utilizó para convertir la lectura de la señal en el valor de concentración correspondiente.

Ejemplo 6: Detección de TWEAK total

15 Con el fin de evaluar el efecto de la presencia del compuesto fármaco, se añadieron a la matriz artificial (EKM) 5 ng/ml de TWEAK recombinante (rec.) (resultados mostrados en la figura 2) y se añadieron dos muestras nativas (resultados mostrados en la figura 3), respectivamente, con 515 µg/ml del compuesto fármaco. Se compararon los resultados para muestras sin anticuerpo antiidiotípico (sin antic.) y con un amplio exceso de anticuerpo antiidiotípico (M-2.38.37).

20 Aunque no se observó ninguna señal detectable en muestras que contenían el anticuerpo terapéutico, el nivel de la señal podía restaurarse al nivel de una muestra sin anticuerpo terapéutico mediante la adición de anticuerpo antiidiotípico. Lo anterior seguía siendo cierto para muestras con adición de tampón, así como para muestras de suero con adición. De esta manera resulta posible determinar la diana libre y la diana total (independiente de la unión anterior del anticuerpo terapéutico) de un único tubo para muestra en una única tanda.

25

## REIVINDICACIONES

1. Método in vitro para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en presencia de una molécula de unión capaz de unirse mediante su sitio de unión al analito, comprendiendo el método las etapas de:

(i) poner en contacto una muestra que comprende el analito y la molécula de unión con:

- una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión y
- una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito y

(ii) detectar el complejo de molécula de detección-analito, determinando de esta manera la cantidad total y/o la concentración del analito,

en el que la molécula de detección es diferente de la molécula de unión y

en el que el analito es diferente de la molécula atrapadora y

en el que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión, y

en el que la molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la molécula atrapadora facilita la liberación esencialmente completa del analito respecto de la molécula de unión.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que

-  $K(\text{capt.}) / K(\text{molécula de unión})$  es de por lo menos 3, preferentemente de 5, más preferentemente de por lo menos 10, y/o

-  $\text{Conc}(\text{capt.}) / \text{Conc}(\text{molécula de unión})$  es de por lo menos 3, preferentemente de 5, más preferentemente de por lo menos 10 y/o

-  $(K(\text{capt.}) / K(\text{molécula de unión})) \times (\text{Conc}(\text{capt.}) / \text{Conc}(\text{molécula de unión}))$  es de por lo menos 3, preferentemente de 5, más preferentemente de por lo menos 10, y/o

-  $(K(\text{capt.}) / K(\text{molécula de unión})) \times (\text{Conc}(\text{capt.}) / \text{Conc}(\text{molécula de unión})) \times (\text{MR}(\text{capt.}) / \text{MR}(\text{molécula de unión}))$  es de por lo menos 3, preferentemente de 5, más preferentemente de por lo menos 10,

en el que  $K(\text{capt.})$  es la afinidad de la molécula atrapadora para la molécula de unión y  $K(\text{molécula de unión})$  es la afinidad de la molécula de unión para el analito, y

En el que  $\text{Conc}(\text{capt.})$  y  $\text{Conc}(\text{molécula de unión})$  son las concentraciones molares de la molécula atrapadora y la molécula de unión, respectivamente, en la etapa i), en particular en la que  $\text{Conc}(\text{molécula de unión})$  se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 y 5  $\mu\text{moles/l}$  y/o  $\text{Conc}(\text{capt.})$  se encuentra comprendida en el intervalo de  $3^*(1$  a 5)  $\mu\text{moles/l}$ , y

en el que  $\text{MR}(\text{capt.})$  es la valencia de unión de la molécula atrapadora para la unión a la molécula de unión y  $\text{MR}(\text{molécula de unión})$  es la valencia de unión de la molécula de unión para la unión al analito.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

- la afinidad de la molécula de detección para la unión al analito es de por lo menos  $10^8$  (moles/l)<sup>-1</sup>, más preferentemente de  $10^9$  (mol/l)<sup>-1</sup>, todavía más preferentemente de por lo menos  $10^{10}$  (mol/l)<sup>-1</sup>, y/o

- la afinidad de la molécula atrapadora para la unión a la molécula de unión es de por lo menos  $5 \times 10^9$  (moles/l)<sup>-1</sup>, más preferentemente es de por lo menos  $10^{10}$  (moles/l)<sup>-1</sup>, y/o

- la concentración molar de la molécula de detección es como máximo de 5%, preferentemente de como máximo 3%, más preferentemente de como máximo 1%, todavía más preferentemente de como máximo 0,5%, más preferentemente de como máximo 0,1% de la concentración molar de la molécula de unión en la muestra.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección del complejo de molécula de detección-analito se lleva a cabo en un ensayo no competitivo, en particular en un ensayo de tipo sándwich, especialmente en el que el ensayo de tipo sándwich utiliza una molécula de captura capaz de unión al analito, y en el que:

- la molécula de captura porta medios para la inmovilización, y

- la molécula de detección y la molécula de captura se unen a epítomos no solapantes diferentes en el analito.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:

- la molécula de unión es o comprende un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo, y/o

- la molécula atrapadora es o comprende un anticuerpo antiidiotipo dirigido contra el sitio de unión a antígeno de la molécula de unión o una parte funcionalmente activa del mismo, y/o

- la molécula de detección es o comprende un anticuerpo o parte funcionalmente activa del mismo, y/o
- la molécula de captura es o comprende un anticuerpo o una parte funcionalmente activo del mismo,

5 en particular en la que la molécula atrapadora, la molécula de unión, la molécula de detección y la molécula de captura son o comprenden, cada una, anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:

- la molécula de unión es o comprende un anticuerpo, una parte funcionalmente activa de un anticuerpo, un receptor o un fragmento de receptor, en particular un anticuerpo terapéuticamente activo, o parte funcionalmente activa terapéuticamente activa de un anticuerpo o un receptor terapéuticamente activo o un fragmento de receptor terapéuticamente activo, y/o
- el analito es un compuesto químico, preferentemente una hormona, péptido o proteína, una molécula circulante en la sangre de un animal o ser humano, o un biomarcador, en particular un marcador tumoral, y/o
- 15 - la molécula de detección porta medios para el marcaje detectable, en particular medios para la detección directa o indirecta.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el analito es una proteína y/o en la que las proteínas en la muestra no se encuentran desnaturalizadas o irreversiblemente desnaturalizadas.

20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que:

- se lleva a cabo una etapa de lavado después de la etapa (i), o
- no se lleva a cabo ninguna etapa de lavado después de la etapa (i),
- 25 preferentemente no se lleva a cabo ninguna etapa de lavado después de la etapa (i).

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que:

- 30 - la muestra es un líquido, en particular un líquido acuoso, sangre o suero sanguíneo y/o
- la concentración del analito en la muestra, en particular sangre o suero sanguíneo, se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 pg/ml y 20 µg/ml, preferentemente de entre 1 ng/ml y 10 µg/ml, y/o
- 35 - la molécula de unión, en particular un agente terapéutico o diagnóstico, ha sido administrada en el sujeto del que se ha obtenido la muestra.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el método comprende:

- 40 i) llevar a cabo la etapa (i) tal como se define en las reivindicaciones 1 a 10,
- ii) llevar a cabo la etapa (ii) tal como se define en las reivindicaciones 1 a 10, y
- iii) determinar adicionalmente, en ausencia de molécula atrapadora, la cantidad y/o concentración de analito libre en la muestra, que no se une a la molécula de unión, y determinar opcionalmente la cantidad y/o concentración y/o proporción de analito unido a la molécula de unión en la muestra.

45 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que:

- la cantidad total y/o la concentración del analito es indicativa de la ausencia, presencia y/o severidad de una enfermedad en un paciente y/o
- 50 - la cantidad total y/o la concentración es indicativa de la respuesta terapéutica de un paciente a un tratamiento, en particular en el que el paciente ha sido tratado con la molécula de unión y/o
- la cantidad y/o la concentración y/o la proporción de analito unido a la molécula de unión en la muestra es indicativo de la ausencia, presencia y/o severidad de una enfermedad de un paciente y/o la respuesta terapéutica de un paciente a un tratamiento, en particular en el que el paciente ha sido tratado con la molécula de unión y/o
- 55 - el método se utiliza para el seguimiento de la terapia, en particular en la terapia del cáncer.

13. Kit o composición adecuado para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en una muestra, comprendiendo además dicha muestra una molécula de unión capaz de unirse al analito, que comprende:

- 60 a) una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito, y
- b) una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión, y
- c) el analito, y
- d) la molécula de unión capaz de unión al analito, y
- e) opcionalmente una molécula de captura porta medios para la inmovilización del analito,

65 en el que la molécula de detección es diferente de la molécula de unión y en el que el analito es diferente de la molécula atrapadora y

en el que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión, y

en el que la molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor,

5 en particular en el que el kit o composición resulta adecuado para la utilización en cualquiera de los métodos según las reivindicaciones 1 a 12.

14. Kit o composición adecuado para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en una muestra, comprendiendo además dicha muestra una molécula de unión capaz de unirse al analito,

10 - en cualquiera de los métodos según las reivindicaciones 1 a 12, y/o  
- para determinar la cantidad total y/o la concentración de un analito en una muestra, preferentemente en el que el analito es un biomarcador y/o la muestra es sangre o suero sanguíneo, y/o

15 - para determinar la respuesta terapéutica de un paciente al tratamiento, en particular en el que el paciente es tratado con la molécula de unión,

en el que el kit o composición comprende:

- 20 a) una molécula de detección capaz de formar un complejo con el analito, y  
b) una molécula atrapadora dirigida contra el sitio de unión de la molécula de unión, y  
c) opcionalmente el analito, y  
d) opcionalmente la molécula de unión capaz de unión al analito, y  
e) opcionalmente una molécula de captura porta medios para la inmovilización del analito,

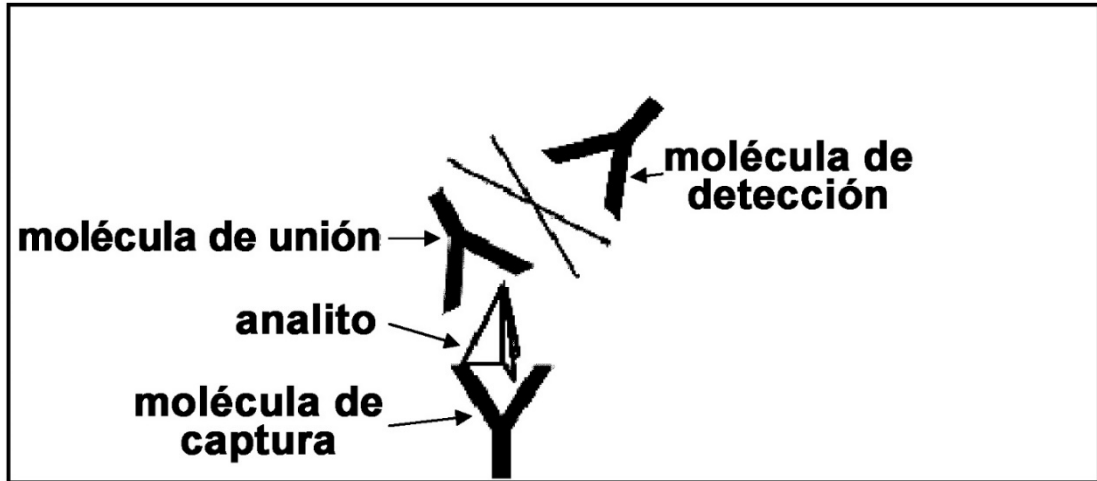
25 en el que la molécula de detección es diferente de la molécula de unión y  
en el que el analito es diferente de la molécula atrapadora y

en el que la molécula de detección sólo es capaz de formar un complejo con el analito en el caso de que el analito no se una a la molécula de unión, y

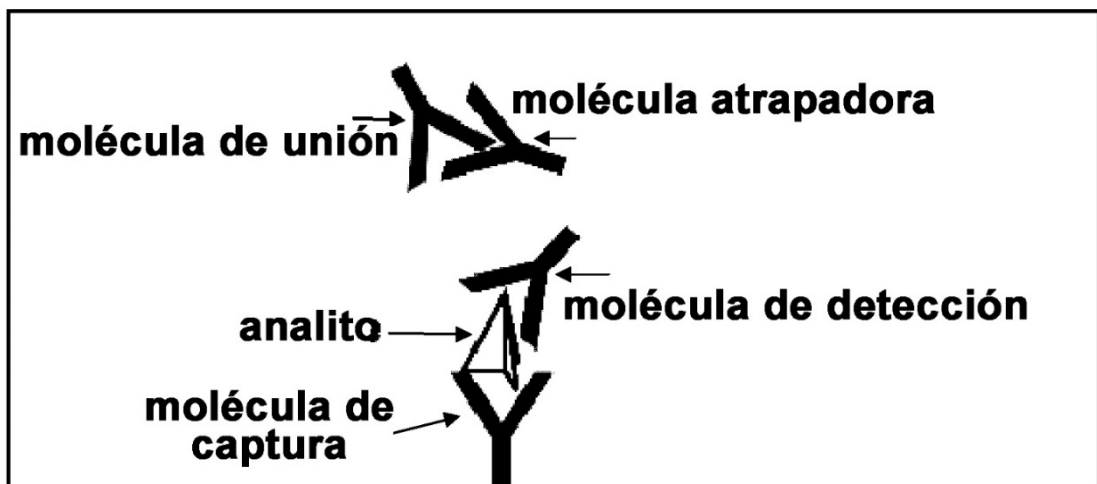
30 en el que la molécula atrapadora es un anticuerpo o parte funcionalmente activa de un anticuerpo o un receptor o fragmento de receptor.

**Fig. 1:**

**A)**

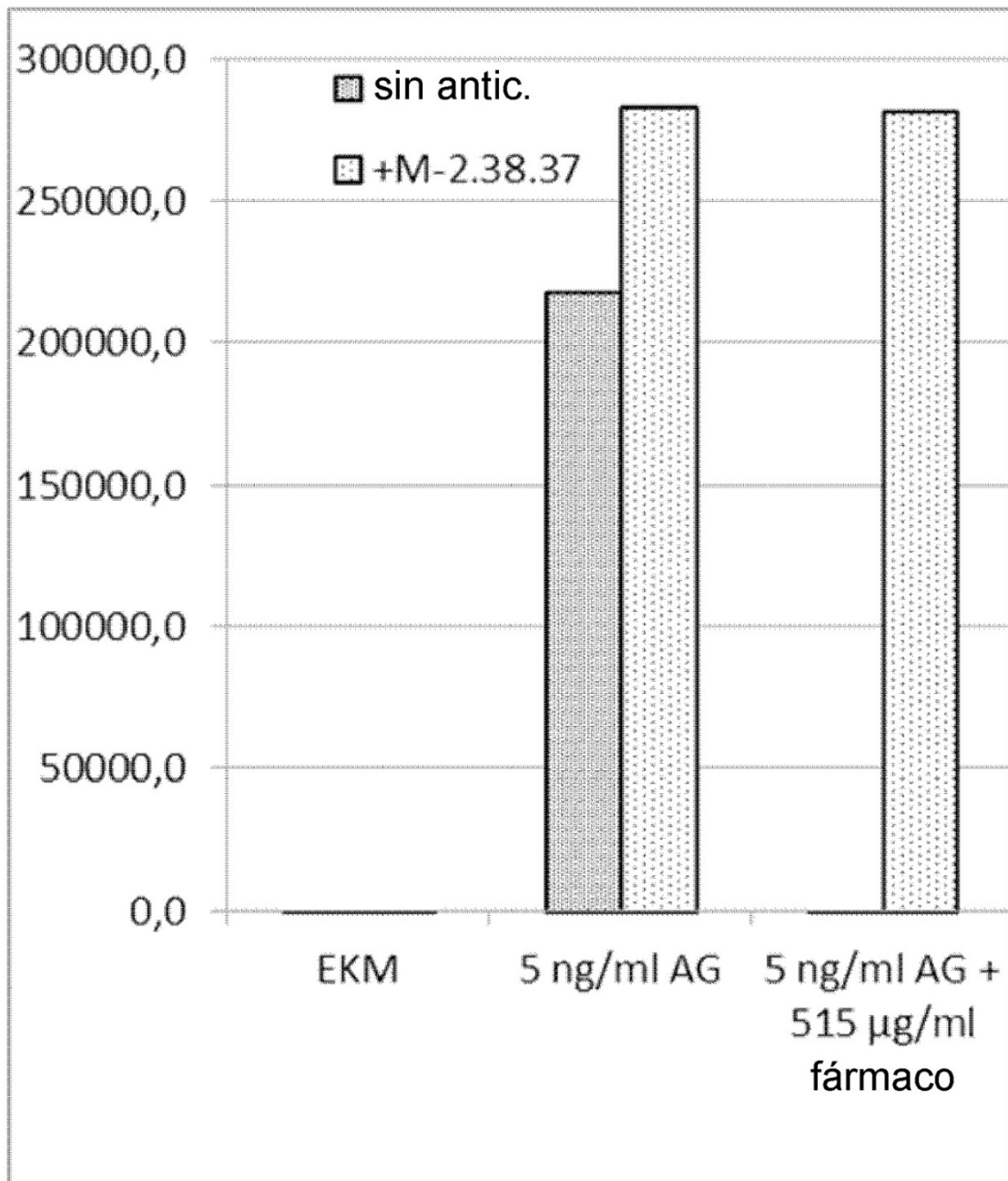


**B)**





**Fig. 2:**



**Fig. 3:**

