

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 130**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/42** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2013 PCT/EP2013/066625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14026905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2013 E 13752873 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2885639**

54 Título: **Anticuerpos específicos de complejos y fragmentos de anticuerpo y su uso**

30 Prioridad:

**17.08.2012 EP 12180835**  
**20.08.2012 US 201261684836 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.12.2019**

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)**  
**Semmelweisstrasse 7**  
**82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**HÄRTLE, STEFAN;**  
**FRISCH, CHRISTIAN y**  
**KNAPPIK, ACHIM**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 734 130 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos de complejos y fragmentos de anticuerpo y su uso

**Antecedentes de la invención**

5 Las inmunoglobulinas, como los anticuerpos, tienen un interés constante y creciente para la industria farmacéutica. Desde el año 2000, el mercado terapéutico de los anticuerpos monoclonales ha crecido de manera exponencial y en el año 2007, ocho de los 20 fármacos de biotecnología más vendidos en los EE.UU. eran anticuerpos monoclonales terapéuticos, cada uno con ventas anuales mundiales de más de 5 mil millones de dólares.

10 Actualmente, un número significativo de anticuerpos y también derivados y fragmentos de inmunoglobulinas se encuentran en desarrollo preclínico y clínico. Antes de participar en estudios con seres humanos, el fármaco que se está investigando se debe analizar y caracterizar mediante pruebas extensas para el descubrimiento y preclínicas. Se deben explorar criterios importantes como las características toxicológicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas para establecer un perfil farmacológico seguro y potente. Con el fin de cuantificar y realizar un seguimiento de los niveles de anticuerpos terapéuticos, muchos de estos estudios requieren el uso de agentes específicos de los fármacos para la detección específica del anticuerpo terapéutico en una matriz de muestra, como p. ej., los sueros o cualquier líquido corporal procedente de un paciente o un animal experimental.

15 Los agentes específicos de fármacos incluyen, p. ej., anticuerpos que solo detectan una inmunoglobulina humana o humanizada y que, por lo tanto, se pueden usar para cuantificar un anticuerpo terapéutico humano o humanizado en una muestra obtenida a partir de un hospedador experimental no humano (véase, p. ej., el documento WO2006066912; n° de serie de EE.UU. 11/792.910). Un paso más es el uso de anticuerpos anti-idiotípicos o fragmentos de anticuerpos, que son específicos de una estructura única dentro del anticuerpo terapéutico. Por lo tanto, los anticuerpos anti-idiotípicos se pueden usar para detectar un anticuerpo terapéutico específico o un fragmento de anticuerpo en una matriz de muestra, independientemente del hospedador a partir del cual se aisle la muestra (véase, p. ej. el documento WO2009032128). Sin embargo, debido a que la gran mayoría de los anticuerpos anti-idiotípicos se unen a una o a varias de las CDRs únicas del anticuerpo terapéutico y las CDRs definen el paratopo que interacciona específicamente con el antígeno del anticuerpo terapéutico, solo es posible la detección y el seguimiento de anticuerpos terapéuticos libres, no unidos a antígenos.

20 El documento US 2012/0157663 describe los llamados "anticuerpos dominó" que tienen la capacidad de unirse a un anticuerpo solo si el anticuerpo está unido al antígeno respectivo. Los anticuerpos del documento US 2012/0157663 se generan a través de una tecnología de escrutinio específica, basada en hibridomas. Es común a todos los anticuerpos dominó que el epítipo del anticuerpo dominó sobre el anticuerpo diana se forme a través de un cambio conformacional al unirse el anticuerpo diana a su antígeno respectivo. El epítipo está ubicado en la región constante del anticuerpo diana (por ejemplo, la región constante de la cadena ligera) y no incluye ni ninguna parte del antígeno ni la región CDR del anticuerpo diana. En contraste, los anticuerpos específicos de un complejo y los fragmentos de anticuerpo de la presente descripción se unen al menos a ciertas partes de las regiones CDRs del anticuerpo diana. Por lo tanto, aunque los anticuerpos dominó solo reconocen los anticuerpos diana cuando los anticuerpos diana se unen a su antígeno respectivo, los anticuerpos dominó también se unen a otros anticuerpos diana con la misma especificidad de antígeno, es decir, son panespecíficos para ese caso. En contraste, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo de la presente descripción son específicos de un único anticuerpo diana, y solo se unen a ese anticuerpo diana cuando el anticuerpo diana se ha unido a su antígeno.

30 El documento US 2011/0236994 proporciona un método para detectar indirectamente complejos terapéuticos de anticuerpo-antígeno en una muestra empleando un ELISA de tipo sándwich, en donde un anticuerpo reconoce el antígeno y un segundo anticuerpo reconoce el anticuerpo. Por consiguiente, no existe ninguna descripción en el documento 2011/0236994 sobre un método para identificar anticuerpos específicos de complejos como el que se proporciona en la presente descripción.

35 El documento US 2011/0195438 describe un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un complejo de insulina y un anticuerpo anti-insulina, pero que no se une a la insulina humana sola. El anticuerpo específico del complejo en el documento US 2011/0195438 se obtiene a través de un método basado en hibridomas mediante la inmunización de ratones únicamente con el antígeno diana (por ejemplo, insulina humana). De este modo, el anticuerpo solo reconoce la parte del antígeno en el complejo con un anticuerpo específico de antígeno. En otras palabras, el anticuerpo obtenido por el método descrito en el documento US 2011/0195438 es específico de un solo antígeno pero no es específico de un solo anticuerpo cognado.

40 Dado que un anticuerpo terapéutico que se había aplicado a un paciente siempre está equilibrado entre diferentes estados dentro de la periferia del cuerpo del hospedador, el seguimiento y la proporción de esos diferentes estados proporciona una información obligatoria sobre la seguridad del anticuerpo terapéutico. Esos diferentes estados están equilibrados de acuerdo con la ley de acción de masas y comprenden el anticuerpo total, el anticuerpo no unido y el anticuerpo unido y dicho equilibrio es dependiente, p. ej., de la afinidad del anticuerpo terapéutico y también de la concentración del antígeno en el cuerpo. Además, debido al aclaramiento relativamente lento de los anticuerpos terapéuticos en el cuerpo, el anticuerpo terapéutico unido a su antígeno conduce frecuentemente a un aumento de

los niveles de antígeno después de su administración durante un periodo más prolongado (Charles P. (1999) Journal of Immunology 163; 1521-1528). En presencia del anticuerpo terapéutico, el antígeno unido se neutraliza y predominantemente no es bioactivo. Sin embargo, este fenómeno debe ser controlado y es importante, por ejemplo, para evaluar el riesgo de una retirada brusca del fármaco.

5 En conjunto, la detección específica del anticuerpo total, el anticuerpo no unido y el anticuerpo unido es de particular interés e importancia para la caracterización y la aprobación posterior de un anticuerpo terapéutico (Kuang B. (2010) Bioanalysis, 2(6): 1125-40). Solamente se ejemplifican unos pocos anticuerpos anti-idiotípicos que son capaces de unirse al anticuerpo terapéutico no unido y que también son capaces de unirse al complejo (anticuerpo terapéutico unido a su antígeno) y que, por lo tanto, son útiles para detectar la carga total de anticuerpo. Un anticuerpo anti-idiotípico no paratópico de este tipo se describe en el documento WO2009032128.

10 En contraste, casi todos los anticuerpos anti-idiotípicos se dirigen a las CDRs del anticuerpo diana y, por lo tanto, solo detectan anticuerpos no unidos (véase, por ejemplo, Tornetta M. (2007) Journal of Immunological Methods 328, 34-44).

15 Sin embargo, ni el uso del anticuerpo anti-idiotípico específico de una CDR ni el uso del anticuerpo anti-idiotípico no paratópico permiten la detección directa y la cuantificación de únicamente el complejo de fármaco-antígeno. Para cuantificar el anticuerpo unido, se establecen diversos ensayos basados en ELISA, pero siempre requieren el uso de anticuerpos secundarios, p. ej., Fc anti-humano, para una detección indirecta. El uso de anticuerpos de detección específicos de Fc requiere una etapa adicional y un lavado a fondo para capturar y aislar el complejo de la inmunoglobulina de los sueros y, por lo tanto, esos ensayos son susceptibles de tener ruido de fondo y variaciones en las señales.

20 Por consiguiente, se necesitan enfoques más sensibles y fuertes para detectar y cuantificar los complejos de antígeno-anticuerpo.

### Compendio de la invención

25 La presente invención se refiere a un método para identificar un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento del mismo que se une específicamente al complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno y no se une ni a dicho anticuerpo cognado solo ni a dicho antígeno solo, comprendiendo dicho método

(a) escrutar una genoteca de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos frente a un complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno en presencia del antígeno no unido y un anticuerpo que tiene el mismo isotipo que el anticuerpo cognado específico,

30 (b) aislar dicho complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno y los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos, e

(c) identificar y aislar dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

35 La presente descripción describe anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que detectan específicamente y se unen al complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno. Los anticuerpos de la presente descripción no se unen ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo y, por lo tanto, se pueden usar para detectar directamente anticuerpos terapéuticos unidos sin usar anticuerpos secundarios específicos de Fc.

40 La presente descripción también describe anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que detectan específicamente y se unen al complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno. En particular, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos de la presente descripción no se unen al complejo de otros anticuerpos cognados con la misma especificidad de antígeno.

45 Estos anticuerpos específicos de un complejo permiten métodos superiores para cuantificar complejos de antígeno-anticuerpo pero también un fármaco libre o no unido en muestras aisladas a partir de pacientes humanos o animales experimentales. Ensayos más sensibles y más fuertes, como por ejemplo, configuraciones de ELISA, se describen en el presente documento y proporcionan ensayos alternativos y mejorados para estudios farmacocinéticos. Además, los ensayos de cuantificación descritos en el presente documento se pueden usar para desarrollar pruebas en el lugar de atención utilizando, por ejemplo, técnicas de flujo lateral para controlar los niveles de fármaco.

La presente descripción describe además el uso de dichos anticuerpos en ensayos para la detección de dichos complejos. Además, la presente descripción describe métodos para identificar anticuerpos que detectan específicamente el complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno.

### 50 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa los resultados de 7 anticuerpos analizados para determinar la unión específica en un ELISA frente a una serie de antígenos relacionados y no relacionados y el complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$ . Una placa de microtitulación se recubrió con 5  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los antígenos durante una noche. Después de lavar y bloquear con BSA al 5%, se añadieron anticuerpos anti-Adalimumab/TNF- $\alpha$  en formato Fab-FH

(20 µl de una solución de 2 µg/ml). La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-His marcado con HRP y un sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu.

La **Figura 2** representa los resultados de una titulación de AdaTNF#5 sobre diferentes antígenos inmovilizados en un ELISA. A lo largo del intervalo de concentración sometido a ensayo (0,03 a 2000 ng/mL), AdaTNF#5 se unía solo al complejo de Adalimumab/TNF-α pero no a sus componentes por separado y a otros antígenos.

La **Figura 3** representa los resultados de AdaTNF#5 purificado convertido en una IgG1 humana de longitud completa sometida a ensayo sobre varios antígenos en un ELISA. El AdaTNF#5-IgG1 purificado conjugado con HRP se une específicamente al complejo de Adalimumab y TNF-α.

La **Figura 4** representa los resultados de un ensayo ELISA farmacocinético. Una placa de microtitulación se recubrió con TNF-α humano y concentraciones crecientes de Adalimumab se añadieron a un suero humano al 10% y se aplicaron sobre la placa recubierta previamente. Después del lavado, se añadió el anticuerpo de hlgG1 anti-Adalimumab/TNF-α, AdaTNF#5 (conjugado con HRP) a 2 µg/ml. La detección se realizó mediante la adición de sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu®. AdaTNF#5 se unía al complejo de Adalimumab/TNF-α de una manera dependiente de la dosis en presencia de suero humano.

La **Figura 5** representa los resultados de IFX-TNF#1, IFX-TNF#2 e IFX-TNF#3 sometidos a ensayo sobre varios antígenos en un ELISA. Por lo tanto, una placa de microtitulación se recubrió con 5 µg/mL de cada uno de los antígenos y se añadieron los anticuerpos anti-Infliximab/TNF-α en formato Fab-FH (20 µL de una solución de 2 µg/mL). IFX-TNF#1 mostraba una detección específica del complejo de Infliximab/TNF-α (FIGURA 5).

La **Figura 6** representa los resultados de un ELISA de escrutinio para detectar los anticuerpos anti-complejo de MOR103/GM-CSF. Una placa de microtitulación se recubrió con 5 µg/ml de cada uno de los antígenos (BSA, GST, MOR03207 y MOR103). Además, el complejo de MOR103/GM-CSF también se inmovilizó sobre la placa. M103GmCSF#1, M103GmCSF#2 y M103GmCSF#3 detectan específicamente el complejo de MOR103/GM-CSF pero no GM-CSF o MOR103 solos.

La **Figura 7** representa los resultados de una prueba ELISA de M103GmCSF#1 para analizar la selectividad de la diana. Una placa recubierta con avidina se recubrió con MOR103 solo, el GM-CSF biotinilado o el GM-CSF biotinilado unido a MOR103. El Fab M103GmCSF#1 marcado con His se añadió en concentraciones crecientes y se detectó. M103GmCSF#1 mostraba una selectividad elevada para unirse al complejo de fármaco-diana y no a las proteínas individuales (fármaco y diana).

La **Figura 8** representa los resultados de un ensayo de unión de ligandos basado en MSD® (Meso Scale Discovery) para cuantificar los complejos de MOR103/GM-CSF en suero humano. Los complejos de MOR103/GM-CSF se complementaron con suero humano y se titularon sobre una placa Standard de 96 pocillos de Multiarray®. La IgG M103GmCSF#1 marcada con ECL se utilizó para detectar los complejos de MOR103/GM-CSF. A lo largo de la curva de titulación, los complejos de MOR103/GM-CSF se detectaron específicamente en presencia de un suero humano al 50% de una manera dependiente de la dosis.

### Descripción detallada de la invención

Por lo tanto, en un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno. En una realización, el anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo, se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno y no se une a dicho resto que se une a antígeno cognado solo o a dicho antígeno solo.

#### Anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo

En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo en donde el anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo, se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno con una concentración  $CE_{50}$  inferior a 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo en donde el anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno con una constante de disociación ( $K_D$ ) de menos de  $1 \times 10^7 M^{-1}$ ,  $10^8 M^{-1}$ ,  $10^9 M^{-1}$ ,  $10^{10} M^{-1}$ ,  $10^{11} M^{-1}$ ,  $10^{12} M^{-1}$  o  $10^{13} M^{-1}$ .

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo en donde el anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En una realización, dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización, dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico. En una realización, dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende una región constante de la cadena pesada humana y una región constante de la cadena ligera humana. En una realización, dicho anticuerpo aislado es un isotipo IgG. En

otra realización, los anticuerpos pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o derivados de los mismos (por ejemplo, IgG1f LALA). En una realización, los anticuerpos tienen el isotipo IgG1f LALA. En una realización, dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo se selecciona a partir del grupo que consiste en un Fab, F(ab2)', F(ab)2' y scFV. En una realización, el anticuerpo aislado se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo sintético. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo humano o humanizado.

#### **El resto que se une a antígeno cognado**

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno. En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno. En una realización, dicho resto que se une a antígeno cognado, o dicho resto que se une a antígeno cognado específico, es un anticuerpo cognado o un fragmento del mismo. En una realización, dicho anticuerpo cognado o un fragmento del mismo, o dicho anticuerpo cognado específico o un fragmento del mismo, es un anticuerpo terapéutico o un fragmento de anticuerpo terapéutico. En otra realización, dicho anticuerpo cognado o un fragmento del mismo, o dicho anticuerpo cognado específico o un fragmento del mismo, es un anticuerpo de diagnóstico o un fragmento de anticuerpo de diagnóstico.

En una realización preferida, el anticuerpo cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal cognado específico o un fragmento del mismo. Un "anticuerpo monoclonal cognado específico" se refiere a uno, y solo a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a su antígeno. Los anticuerpos diana de los denominados "anticuerpos dominó" (véase, el documento US 2012/0157663) no son anticuerpos cognados específicos según esa definición, ya que los anticuerpos dominó se unen a la región constante de sus anticuerpos diana y, por lo tanto, no son específicos de un solo anticuerpo, sino de todos, o al menos de numerosos anticuerpos con cierta especificidad de la diana.

En una realización preferida, el anticuerpo cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo.

En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico. En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo comprende una región constante de la cadena pesada humana y una región constante de la cadena ligera humana. En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado tiene un isotipo IgG. En otra realización, los anticuerpos cognados pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o derivados de los mismos (por ejemplo, IgG1f LALA). En una realización, los anticuerpos cognados tienen el isotipo IgG1f LALA.

En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo se selecciona a partir del grupo que consiste en un Fab, F(ab2)', F(ab)2' y scFV. En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo sintético. En una realización, el anticuerpo cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo humano o humanizado.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, en donde el resto que se une a antígeno cognado es una estructura obtenida a partir de un anticuerpo. En una realización, la estructura obtenida a partir de un anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en un scFv, un anticuerpo tetravalente, un Fab reticulado o una IgG. En una realización, el anticuerpo cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo de cadena única.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, en donde el resto que se une a antígeno cognado se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR, anticuerpos de camélido, anquirinas, anticuerpos de dominio, lipocalinas, inmunofármacos modulares pequeños, maxicuerpos, proteína A y afininas.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, en donde el resto que se une a antígeno cognado se selecciona a partir de una lista que consiste, pero no se limita a, Adalimumab, MOR103, Rituximab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab, Cetuximab, Gemtuzumab, Infliximab, Ranibizumab, Ustekinumab, Golimumab, Natalizumab, Ofatumumab, Omalizumab, Panitumumab.

#### **El antígeno**

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, en donde el antígeno es una proteína. En una realización preferida, la proteína es una proteína humana.

5 El epítipo del anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de la presente descripción incluye uno o varios aminoácidos de una región variable del anticuerpo cognado específico. Por lo tanto, en ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, en donde el epítipo de dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo incluye uno o varios aminoácidos de una región variable del anticuerpo cognado específico. En otros aspectos, la presente descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal  
10 mismo incluye uno o varios aminoácidos de una región variable de un anticuerpo cognado específico y uno o varios aminoácidos del antígeno de dicho anticuerpo cognado específico.

En otros aspectos, la presente descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, en donde el epítipo de dicho anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo incluye segmentos de ambos, un anticuerpo cognado específico y el antígeno de dicho anticuerpo cognado específico.

15 En una realización, la proteína está asociada con un trastorno específico. En una realización, la proteína es una diana útil para una terapia biológica específica en un trastorno específico. En una realización, la proteína es una diana útil para un fármaco específico. En una realización, la proteína es una diana útil para un anticuerpo terapéutico o un fragmento del mismo. En una realización, la proteína es una diana útil para un anticuerpo de diagnóstico o un fragmento del mismo. En una realización, la proteína es una citocina. En una realización, la proteína es un receptor.

20 En una realización, la proteína está asociada con una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una infección vírica, bacteriana y parasitaria, una enfermedad maligna, una enfermedad neurodegenerativa o cualquier enfermedad asociada con tumores. En una realización, la proteína está asociada con el cáncer.

En una realización, la proteína se selecciona a partir de una lista que consiste, pero no se limita a, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VEGF-A, integrina  $\alpha 4$ , CD20, IgE (región Fc), EGFR, GM-CSF, CD19, M-CSF, CD38, MIF, DDT, IL-17A, IL-17C, IL-1  
25  $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, Her2/c-neu, CD52, CD33.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, en donde el complejo se selecciona a partir de un grupo que consiste pero no se limita a, Adalimumab/TNF- $\alpha$ , MOR103/GM-CSF, Trastuzumab/Her2/c-neu, Alemtuzumab/CD52, Bevacizumab/VEGF-A, Cetuximab/EGF-R, Gemtuzumab/CD33, Infliximab/TNF- $\alpha$ ,  
30 Ranibizumab/VEGF-A, Ustekinumab/IL-12, Ustekinumab/IL-23, Golimumab/TNF- $\alpha$ , Natalizumab/integrina  $\alpha 4$ , Ofatumumab/CD20, Rituximab/CD20, Omalizumab/IgE (región Fc), Panitumumab/EGFR.

### **Uso del anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo**

En un aspecto, la descripción se refiere al uso de un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo para la detección de un complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o un complejo de un resto que se une a  
35 antígeno cognado específico y su antígeno, en una muestra, en donde dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o el complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, en una muestra empleando un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une específicamente al complejo de un  
40 resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o el complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, en una muestra, en donde el método comprende las etapas de

- 45
- a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo se une específicamente a dicho complejo y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo
  - 50 b) detectar dicho anticuerpo aislado o un fragmento unido a dicho complejo.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, en una muestra, en donde el método comprende las etapas de

- a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, en donde dicho anti-

cuerpo aislado o un fragmento del mismo se une específicamente a dicho complejo y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo

b) detectar dicho anticuerpo aislado o fragmento unido a dicho complejo, y

5 c) correlacionar dicho anticuerpo aislado o fragmento unido a dicho complejo con la concentración del resto que se une a antígeno cognado, unido al antígeno.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar el complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno, o el complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno, en una muestra, en donde el método comprende las etapas de

a) proporcionar la muestra que se va a analizar,

10 b) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo aislado o un fragmento del mismo se une específicamente a dicho complejo y no se une ni a dicho anticuerpo cognado solo ni a dicho antígeno solo,

c) detectar dicho anticuerpo aislado o fragmento unido a dicho complejo, y

15 d) correlacionar dicho anticuerpo aislado o fragmento unido a dicho complejo con la concentración del anticuerpo cognado unido a antígeno.

En una realización, dicho resto que se une a antígeno cognado es un anticuerpo cognado o un fragmento del mismo. En una realización preferida, el anticuerpo cognado o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal cognado o un fragmento del mismo. En una realización, dicho fragmento de anticuerpo monoclonal cognado es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización, dicho fragmento de anticuerpo monoclonal cognado es un anticuerpo quimérico. En una realización, dicho fragmento de anticuerpo monoclonal cognado comprende una región constante de la cadena pesada humana y una región constante de la cadena ligera humana. En una realización, dicho anticuerpo monoclonal cognado tiene un isotipo IgG. En otra realización, los anticuerpos cognados pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o derivados de los mismos (por ejemplo, IgG1f LALA). En una realización, los anticuerpos cognados tienen el isotipo IgG1f LALA.

20

En una realización, dicho fragmento de anticuerpo monoclonal cognado se selecciona a partir del grupo que consiste en un Fab, F(ab2)', F(ab)2' y scFV. En una realización, dicho fragmento de anticuerpo monoclonal cognado se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo sintético. En una realización, el fragmento de anticuerpo cognado es un anticuerpo humano o humanizado.

30

En una realización, dicho complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno se selecciona a partir de un grupo que consiste pero no se limita a, Adalimumab/TNF- $\alpha$ , MOR103/GM-CSF, Trastuzumab/Her2/c-neu, Alemtuzumab/CD52, Bevacizumab/VEGF-A, Cetuximab/EGF-R, Gemtuzumab/CD33, Infliximab/TNF- $\alpha$ , Ranibizumab/VEGF-A, Ustekinumab/IL-12, Ustekinumab/IL-23, Golimumab/TNF- $\alpha$ , Natalizumab/integrina  $\alpha$ 4, Ofatumumab/CD20, Rituximab/CD20, Omalizumab/IgE (región Fc), Panitumumab/EGFR.

35

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar un resto que se une a antígeno en una muestra, comprendiendo el método las etapas de

a) inmovilizar el antígeno del resto que se une a antígeno cognado

b) poner en contacto dicho antígeno inmovilizado con dicha muestra

40 c) detectar el complejo formado entre dicho resto que se une a antígeno cognado y su antígeno con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une específicamente con dicho complejo y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar un resto que se une a antígeno cognado no unido en una muestra, comprendiendo el método las etapas de

45 a) inmovilizar el antígeno del resto que se une a antígeno cognado

b) poner en contacto dicho antígeno inmovilizado con dicha muestra

c) detectar el complejo formado entre dicho resto que se une a antígeno cognado y su antígeno con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une específicamente con dicho complejo y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo.

50 En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar un resto que se une a antígeno cognado no

unido en una muestra, comprendiendo el método las etapas de

- a) inmovilizar el antígeno del resto que se une a antígeno cognado
- b) poner en contacto dicho antígeno inmovilizado con dicha muestra
- 5 c) detectar el complejo formado entre dicho resto que se une a antígeno cognado y su antígeno con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une específicamente con dicho complejo y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo, y
- d) correlacionar el complejo formado en b) con la concentración del resto que se une a antígeno cognado no unido en la muestra.

10 En una realización, el método, en donde se realiza dicha detección es mediante un medio seleccionado a partir del grupo que consiste en EIA, ELISA, RIA, inmunoensayo competitivo indirecto, inmunoensayo competitivo directo, inmunoensayo no competitivo, inmunoensayo de tipo sándwich, ensayo de aglutinación y MSD (Meso Scale Discovery). En una realización preferida, dicha detección se realiza mediante un ELISA de tipo sándwich. En otra realización preferida, dicha detección se realiza mediante un ensayo MSD (Meso Scale Discovery).

15 En una realización, la muestra es un tejido o una muestra líquida. En una realización adicional, la muestra líquida es saliva, orina, sangre completa, plasma o suero. En una realización preferida, la muestra se obtiene a partir de un animal experimental o un ser humano. En una realización más preferida, la muestra es sangre completa, plasma o suero obtenido a partir de un ser humano.

20 En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento del mismo que se une específicamente con el complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno y no se une ni a dicho anticuerpo cognado solo ni a dicho antígeno solo, comprendiendo dicho método

- (a) escrutar una genoteca de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos frente a un complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno, o un complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno, en presencia del antígeno no unido y un anticuerpo que tiene el mismo isotipo que el anticuerpo cognado,
- 25 (b) aislar dicho complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno, o dicho complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno, y los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo unidos, e
- (c) identificar y aislar dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

30 En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para identificar un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento del mismo que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno y no se une ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo, en donde dicho método comprende

- (a) escrutar una genoteca de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos frente a un complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno, o dicho complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno, en presencia del antígeno no unido y un anticuerpo que tiene el mismo isotipo y la misma región estructural que el anticuerpo cognado,
- 35 (b) aislar dicho complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno, o dicho complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno, y el resto que se une a antígeno unido, e
- (c) identificar y aislar dicho resto que se une a antígeno.

40 En un aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende uno o varios anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, y que no se unen ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo, y al menos un reactivo o un dispositivo necesario para la detección de un complejo de ese tipo.

45 En otro aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende uno o varios anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, y al menos un reactivo o un dispositivo necesario para la detección de uno o varios complejos diferentes de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno. En otro aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o al complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, y al menos un reactivo o un dispositivo necesario para la detección de dicho complejo. En  
50 una realización, dicho dispositivo es un dispositivo de flujo lateral.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un dispositivo de flujo lateral, que comprende uno o varios anticuerpos, o

fragmentos de los mismos, que se unen específicamente con el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno o con el complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno. En una realización, dicho uno o varios anticuerpos o fragmentos de los mismos, se unen específicamente con el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno, o con el complejo de un resto que se une a antígeno cognado específico y su antígeno, y no se unen ni a dicho resto que se une a antígeno cognado solo ni a dicho antígeno solo. En una realización adicional, dicho uno o varios anticuerpos se seleccionan a partir del grupo de anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a uno de los complejos seleccionados a partir de un grupo que consiste, pero que no se limita a Adalimumab/TNF- $\alpha$ , MOR103/GM-CSF, Trastuzumab/Her2/c-neu, Alemtuzumab/CD52, Bevacizumab/VEGF-A, Cetuximab/EGF-R, Gemtuzumab/CD33, Infliximab/TNF- $\alpha$ , Ranibizumab/VEGF-A, Ustekinumab/IL-12, Ustekinumab/IL-23, Golimumab/TNF- $\alpha$ , Natalizumab/integrina  $\alpha$ 4, Ofatumumab/CD20, Rituximab/CD20, Omalizumab/IgE (región Fc), Panitumumab/EGFR.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente al complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente con el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente con el complejo de un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno. En una realización, la célula hospedadora es una célula hospedadora procarionota o eucariota. En una realización preferida, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo que compite de forma cruzada con un anticuerpo descrito en la Tabla 1. En una cierta realización, se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo que compite de forma cruzada con un anticuerpo descrito en la Tabla 1 y reduce la unión específica de uno de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en un ensayo de competencia cruzada basada en ELISA.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo que interacciona con (por ejemplo, mediante la unión, estabilización, distribución espacial) el mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la Tabla 1.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo que comprende 6 CDRs definidas por Kabat de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1. En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo que comprende 6 CDRs definidas por Kabat de cada uno de los anticuerpos en la Tabla 1.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o a un fragmento del mismo que comprende una VH y una VL de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo en donde el ácido nucleico comprende una VH y una VL de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia con los ácidos nucleicos descritos en la Tabla 1.

## Definiciones

La expresión "resto que se une a antígeno", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que comprende un polipéptido que confiere la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado. Por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, estructuras de tipo anticuerpo y estructuras alternativas comprenden al menos un resto que se une a antígeno. Los restos que se unen a antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136).

Otros ejemplos de moléculas que comprenden restos que se unen a antígeno se proporcionan a continuación en el presente documento e incluyen fibronectina (Adnexus, propiedad total de Bristol-Myers Squibb, Waltham, MA), anticuerpos de camélido, anquirinas (Molecular Partners AG, Zúrich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalinas (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), pequeños inmunofármacos modulares (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y afininas (gamma-cristalina o ubicuitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

La expresión "región que se une a antígeno" tal y como se usa en este documento, se refiere a un dominio de un resto que se une a antígeno que es responsable de la unión específica entre un resto que se une a antígeno y un antígeno. Por ejemplo, la región que se une a antígeno de un anticuerpo o de un fragmento del mismo está formada por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales de la cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y la cadena ligera (abreviada en este documento como VL). Las regiones variables de la VH y la VL comprenden cada una tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las 3 CDRs de la VH y las 3 CDRs de la VL están dispuestas tridimensionalmente entre sí para formar una superficie que se une a antígeno.

El término "anticuerpo" tal y como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento o cadena sencilla de los mismos. Un "anticuerpo" natural es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Los anticuerpos pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), subclase o una versión modificada de los mismos (por ejemplo, IgG1f LALA).

El término "fragmento" de un anticuerpo se refiere a uno o varios fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "fragmento" incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR) y un fragmento de cadena única (scFv) en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl Acad Sci. 85:5879-5883). Aunque los dos dominios VL y VH están codificados por genes distintos, se pueden unir empleando métodos recombinantes, mediante un enlazador peptídico artificial que les permite formarse como una única cadena de proteína. Tales anticuerpos de cadena única incluyen uno o varios restos que se unen a antígeno. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se escrutan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "antígeno" se define como cualquier molécula o complejo de cualquier molécula que se une específicamente con un resto que se une a antígeno.

El término "complejo" se refiere a una asociación entre al menos dos restos (por ejemplo, químicos o bioquímicos) que tienen afinidad entre sí. "Complejo de proteínas" o "complejo de polipéptidos" se refiere a un complejo que comprende al menos uno o varios polipéptidos. Tal y como se usa en este documento, un complejo comprende un resto que se une a antígeno cognado y su antígeno. En una realización, el complejo es un complejo de anticuerpo-antígeno. En una realización preferida, el complejo es un complejo de anticuerpo-antígeno, que comprende un anticuerpo terapéutico y su antígeno.

El término "cognado" se refiere a componentes que actúan juntos, o que tienen algún aspecto de especificidad uno para el otro, por ejemplo, un ARNt ortogonal y una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal o un anticuerpo y un antígeno. Los componentes también se pueden denominar complementarios. Tal y como se usa en este documento, un resto que se une a antígeno cognado es un resto que se une a antígeno que se une específicamente a su antígeno.

Las expresiones "región variable de cadena pesada CDR1" y "H-CDR1" se usan indistintamente, al igual que las expresiones "región variable de cadena pesada CDR2" y "H-CDR2", las expresiones "región variable de cadena pesada CDR3" y "H-CDR3", las expresiones "región variable de cadena ligera CDR1" y "L-CDR1"; las expresiones "región variable de cadena ligera CDR2" y "L-CDR2" y las expresiones "región variable de cadena ligera CDR3" y "L-CDR3"

La expresión "anticuerpo humano", tal y como se usa en este documento, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las regiones CDRs se obtienen a partir de secuencias de origen humano. Tal y como se usa en este documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa. En ciertos casos, un anti-

cuerpo humano puede ser al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos un 95%, o incluso al menos un 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. De este modo, dicho anticuerpo humano se puede obtener a partir de plataformas tecnológicas que comprenden anticuerpos obtenidos a partir de genes de la línea germinal humana, generados mediante una amplificación con PCR del repertorio de VH/VL, aislado a partir de linfocitos B o generados sintéticamente. Las plataformas tecnológicas incluyen enfoques basados en genotecas que comprenden genes de inmunoglobulina humana mostrados sobre fagos, ribosomas o levaduras. Las tecnologías de visualización respectivas son convencionales en la comunidad científica. Además, la inmunización de un ratón transgénico que es portador de un repertorio de inmunoglobulinas humanas es otro enfoque para generar anticuerpos humanos contra un antígeno de interés. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos seleccionados a partir de una genoteca de anticuerpos basada en el concepto de MorphoSys HuCAL® (Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296: 57-86) son considerados completamente humanos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra un sitio de unión único que tiene una especificidad y afinidad de unión únicas para epítopos particulares.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano aunque es menos inmunogénico en humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, conservando las regiones CDRs no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus equivalentes humanos (es decir, la región constante así como las porciones estructurales de la región variable). Véase, por ejemplo, Morrison et al. (1994) *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81:6851-6855; Morrison y Oi (1988) *Adv. Immunol.*, 44: 65-92; Verhoeyen et al. (1988) *Science*, 239:1534-1536; Padlan, Molec (1991) *Immun.*, 28:489-498; y Padlan, Molec (1994) *Immun.*, 31:169-217. Otros ejemplos de tecnología de modificación genética humana incluyen, pero no se limitan a la tecnología Xoma que se describe en el documento US 5.766.886.

La expresión "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, se reemplaza o se intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferentes o alteradas, o a una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, una toxina, una hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, se reemplaza o se intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón se puede modificar reemplazando su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad para reconocer el antígeno, aunque tiene una antigenicidad reducida en humanos en comparación con el anticuerpo de ratón original.

El término "aislado" se refiere a un compuesto que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un resto que se une a un antígeno que está sustancialmente exento de otros anticuerpos o restos que se unen a un antígeno que tienen diferentes especificidades antigénicas. Además, un resto que se une a un antígeno de un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otros materiales celulares y/o productos químicos.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o varios residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también incluye implícitamente variantes de los mismos modificados de forma conservadora.

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona del crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metilionilada y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteicas como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; el factor de crecimiento endotelial vascular A-F (por ejemplo, VEGF-A); integrina (por ejemplo, integrina  $\alpha 4$ ); trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento plaquetario; los factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento similar a la insulina I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; los factores estimulantes de colonias (CSFs) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, miembros de la familia IL17 (por ejemplo, IL-17C); un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF, ligando de kit (KL), MIF, D-DT. Tal y como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas con la secuencia natural.

El término "receptor" es un término genérico para proteínas que tienen la capacidad de afectar a la actividad biológica, por ejemplo, en una célula, como resultado de la interacción con un ligando específico o moléculas de unión. Los receptores unidos a la membrana celular se caracterizan por un dominio extracelular de unión al ligando, uno o varios dominios que se extienden sobre la membrana o transmembranales, y un dominio efector intracelular que está normalmente involucrado en la transducción de señales. La unión del ligando a los receptores de la membrana celular causa cambios en el dominio extracelular que se comunican a través de la membrana celular, interaccionan directa o indirectamente con una o varias proteínas intracelulares y alteran las propiedades celulares, tales como la actividad enzimática, la forma celular o el perfil de expresión génica. Los receptores también pueden estar desconectados de la superficie celular y pueden ser citosólicos, nucleares o liberados por completo de la célula. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; ser monoméricos (por ejemplo, el receptor de la hormona estimulante de la tiroides, el receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, el receptor de PDGF, el receptor de la hormona de crecimiento, el receptor de IL-3, el receptor de GM-CSF, el receptor de G-CSF I, el receptor de la eritropoyetina y el receptor de IL-6). Ejemplos más particulares de receptores incluyen, pero no se limitan a, agrupaciones adicionales para la diferenciación (por ejemplo, CD20, CD19, CD38, CD52, CD33), inmunoglobulina (por ejemplo, IgE (región Fc)), receptores del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, EGFR) o tirosina cinasas de receptores (RTKs) (por ejemplo, Her2/c-neu, Her3, Her4).

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG, como IgG1 o IgG4) que es proporcionada por los genes de la región constante de la cadena pesada. El isotipo también incluye versiones modificadas de una de esas clases, en donde se han realizado modificaciones para alterar la función de Fc, por ejemplo, para mejorar o reducir las funciones efectoras o la unión a los receptores de Fc. Por ejemplo, IgG1f LALA es una versión modificada del isotipo IgG que tiene funciones efectoras significativamente reducidas. Las sustituciones específicas de aminoácidos reducen la afinidad de la unión hacia el receptor RI de gamma Fc, en comparación con el anticuerpo no modificado. IgG1f LALA se describe en el documento de EE.UU. con nº de serie 08/479.752 (SCOTGEN BIOPHARMACEUTICALS INC.). En ciertas realizaciones de la presente descripción, los restos que se unen a antígeno son anticuerpos y son del tipo IgG, IgM, IgA, IGE o IgD. En realizaciones específicas, los anticuerpos tienen el tipo IgG. En ciertas realizaciones de la presente descripción, los anticuerpos tienen el subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En realizaciones específicas, los anticuerpos tienen el subtipo IgG1 o IgG4. En otras realizaciones específicas, los anticuerpos tienen el subtipo IgG1 o IgG1f LALA.

La expresión "se une específicamente" a un antígeno, se refiere a una reacción de unión que se puede determinar en presencia de un antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. De este modo, las expresiones "que reconoce un antígeno" y "específico de un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "se une específicamente a un antígeno". La unión específica de un resto que se une a un antígeno, como por ejemplo un anticuerpo monoclonal, a un antígeno se puede determinar mediante varios métodos establecidos conocidos en la técnica, e incluyen ELISA, FACS, transferencia de tipo Western, inmunotransferencia, MSD, BIAcore y SET. En la presente descripción, se considera que un resto que se une a un antígeno es específico de un antígeno si se demuestra que el resto que se une a un antígeno es capaz de unirse a un antígeno específico con una señal que es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces mayor que el ruido de fondo. De este modo, el ruido de fondo se determina por un resto que se une a un antígeno que se sabe que es inespecífico para los antígenos seleccionados o mediante una comparación con la unión a un antígeno no relacionado.

"Competir de forma cruzada" significa la capacidad de un anticuerpo u otros restos que se unen a un antígeno para interferir en la unión de otros anticuerpos o restos que se unen a un antígeno, con un antígeno específico en un ensayo de unión competitiva convencional. La capacidad o el grado en que un anticuerpo u otros restos que se unen a un antígeno puede interferir en la unión de otro anticuerpo o restos que se unen a un antígeno, con un antígeno específico y, por lo tanto, si se puede decir que compite de forma cruzada según la descripción, se puede determinar utilizando ensayos de unión competitiva convencionales. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el grado de las interacciones utilizando la tecnología de resonancia de plasmón de superficie. Otro ensayo para medir la competencia cruzada utiliza un enfoque basado en ELISA. Un procedimiento de alto rendimiento para los anticuerpos de "agrupamiento de epítopos" basado en su competencia cruzada, se describe en el documento de Solicitud de Patente Internacional nº WO 2003/48731.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o de interaccionar otra manera con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos o azúcar y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". La expresión "epítipo lineal" se refiere a un epítipo con todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula que interacciona (tal como un anticuerpo) que se establecen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína (continua). La expresión "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo en el que aminoácidos discontinuos se unen en una conformación tridimensional. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados unos de otros.

"Se une al mismo epítipo que" significa la capacidad de un anticuerpo o de otro resto que se une a antígeno para unirse a un antígeno específico y tener el mismo epítipo que el anticuerpo ejemplificado. Los epítipos del anticuerpo ejemplificado y de otros anticuerpos se pueden determinar usando técnicas de cartografiado de epítipos. Las técnicas de cartografiado de epítipos son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los epítipos conformacionales se identifican fácilmente mediante una determinación de la conformación espacial de los aminoácidos, como por ejemplo, mediante el intercambio de hidrógeno/deuterio, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional.

El término "afinidad", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de la interacción entre un resto que se une a antígeno, como p. ej., un anticuerpo monoclonal y un antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interacciona a través de fuerzas no covalentes débiles con un antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones se producen, más fuerte es la afinidad.

El término "KD", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de Kd con Ka (es decir, Kd/Ka) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para los restos que se unen a antígeno como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Los métodos para determinar la KD de un resto que se une a antígeno como, p. ej., un anticuerpo monoclonal son SET (titulación en equilibrio soluble) o resonancia de plasmón de superficie utilizando un sistema biosensor, como un sistema Biacore®. En la presente descripción, un resto que se une a antígeno tiene normalmente una constante de tasa de disociación (KD) (koff/kon) de menos de  $5 \times 10^{-2}$  M, menos de  $10^{-2}$  M, menos de  $5 \times 10^{-3}$  M, menos de  $10^{-3}$  M, menos de  $5 \times 10^{-4}$  M, menos de  $10^{-4}$  M, menos de  $5 \times 10^{-5}$  M, menos de  $10^{-5}$  M, menos de  $5 \times 10^{-6}$  M, menos de  $10^{-6}$  M, menos de  $5 \times 10^{-7}$  M, menos de  $10^{-7}$  M, menos de  $5 \times 10^{-8}$  M, menos de  $10^{-8}$  M, menos de  $5 \times 10^{-9}$  M, menos de  $10^{-9}$  M, menos de  $5 \times 10^{-10}$  M, menos de  $10^{-10}$  M, menos de  $5 \times 10^{-11}$  M, menos de  $10^{-11}$  M, menos de  $5 \times 10^{-12}$  M, menos de  $10^{-12}$  M, menos de  $5 \times 10^{-13}$  M, menos de  $10^{-13}$  M, menos de  $5 \times 10^{-14}$  M, menos de  $10^{-14}$  M, menos de  $5 \times 10^{-15}$  M, o menos de  $10^{-15}$  M o inferior.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría de un tratamiento médico al usar, p. ej., un anticuerpo terapéutico u otros restos que se unen a antígeno. Ejemplos no limitantes de trastornos incluyen enfermedades autoinmunes, inflamación, trastornos de proliferación celular; linfomas de linfocitos B, neoplasias no leucémicas y linfoides; trastornos neuronales, gliales, de astrocitos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromales y blastocélulas; y enfermedades inflamatorias, inmunológicas o infecciosas. Las expresiones "trastorno de proliferación celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno es cáncer.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad autoinmune" se refiere en general a enfermedades que se caracterizan por tener un componente de auto-reconocimiento. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, espondilitis anquilosante, enfermedad de Sjogren, síndrome de CREST, esclerodermia, neuropatía de IgA, penfigoide ampollar, pénfigo vulgar, vasculitis asociada a ANCA, síndrome antifosfolípido y muchos más. La mayoría de las enfermedades autoinmunes también son enfermedades inflamatorias crónicas. Estas se definen como un proceso de enfermedad asociado con una activación a largo plazo (>6 meses) de células inflamatorias (leucocitos). La inflamación crónica conduce a un deterioro de los órganos o los tejidos del paciente. Muchas enfermedades son trastornos inflamatorios crónicos, pero no se sabe si tienen una base autoinmune. Por ejemplo, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, poliarteritis nodosa, enfermedad de Whipple, colangitis esclerosante primaria y muchos más.

El término "cáncer" se refiere a la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma y leucemia. Ejemplos más particulares de cáncer incluyen, pero no se limitan a: cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica (CLL), de pulmón, incluyendo de células no pequeñas (CPNQP), de mama, de ovario, cervical, de endometrio, de próstata, colorrectal, carcinoide intestinal, de vejiga, gástrico, pancreático, hepático (hepatocelular), hepatoblastoma, esofágico, adenocarcinoma pulmonar, mesotelioma, sarcoma sinovial, osteosarcoma, de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, angiofibromas nasofaríngeos juveniles, liposarcoma, de tiroides, melanoma carcinoma de células basales (BCC), meduloblastoma y desmoide. Los cánceres de particular interés para el tratamiento a través de los métodos objeto incluyen gliomas, meduloblastomas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado y cáncer gástrico.

La expresión "anticuerpo terapéutico" se refiere a cualquier preparación de anticuerpo que está destinada para ser utilizada en un ser humano. Preferiblemente, un anticuerpo terapéutico de ese tipo será un anticuerpo monoclonal. Más preferido, un anticuerpo monoclonal de ese tipo se obtendrá a partir de un homínido o será un anticuerpo monoclonal humano. Preferiblemente, será un anticuerpo monoclonal humano. También de forma preferida ese anticuerpo monoclonal terapéutico será un anticuerpo monoclonal humanizado. Los anticuerpos terapéuticos se están utilizando ampliamente para el tratamiento de diversos trastornos, tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo, neoplasias malignas hematológicas y sólidas que incluyen linfoma de no Hodgkin, cáncer de mama y cáncer colorrectal), enfermedades inmunológicas, enfermedades nerviosas centrales, enfermedades vasculares o enfermedades infecciosas. Tales anticuerpos son, en una realización, anticuerpos contra TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VEGF-A, integrina

$\alpha$ 4, CD20, IgE (región Fc), EGFR, GM-CSF, CD19, M-CSF, CD38, MIF, DDT, IL-17C, IL-12, Her2/c-neu, CD52, CD33. Esos anticuerpos son, por ejemplo, Adalimumab, MOR103, Rituximab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab, Cetuximab, Gemtuzumab, Infliximab, Ranibizumab, Ustekinumab, Golimumab, Natalizumab, Ofatumumab, Omalizumab y Panitumumab.

5 El término "muestra" tal y como se utiliza en esta solicitud, indica, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o que anteriormente estaba vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Sustancias de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, saliva, orina, sangre completa, suero o plasma de un individuo. Las fuentes de muestras más utilizadas en la rutina clínica son sangre completa, plasma o suero. En una realización preferida, la muestra se aisló a partir de un paciente. En una realización más preferida, la muestra se aisló a partir de un ser humano.

El término "paciente" tal y como se usa en este documento, indica un mamífero. Preferiblemente, un paciente de acuerdo con la descripción es un ser humano.

15 Tal y como se emplea en este documento, el término "unido" se refiere a una unión o fijación que puede ser covalente, por ejemplo, mediante acoplamiento químico o no covalente, por ejemplo, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, etc. En una realización preferida, la unión o la fijación es una interacción no covalente. En un ejemplo, el término unido se refiere a la fijación de un resto que se une a un antígeno cognado con su antígeno

20 La expresión resto que se une a un antígeno "unido a un antígeno" se utiliza para indicar el resto que se une a un antígeno que está presente en la circulación de un animal experimental o un paciente, que está unido a su antígeno. En una realización adicional, el resto que se une a un antígeno unido a un antígeno es un anticuerpo. En una realización adicional, el resto que se une a un antígeno unido a un antígeno es un anticuerpo terapéutico.

25 El término resto que se une a un antígeno "no unido" se usa para indicar el resto que se une a un antígeno que está presente en la circulación de un animal experimental o un paciente, que no está unido a su antígeno. En una realización adicional, el resto que se une a un antígeno es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización adicional, el resto que se une a un antígeno es un anticuerpo terapéutico.

El término "colección" o "genoteca" significa al menos dos miembros. El término "miembro" incluye, pero no se limita a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos o los anticuerpos o fragmentos de los mismos.

30 El término "genoteca" se refiere a un conjunto de entidades que comprende dos o más entidades que tienen diversidad tal y como se describe en este documento. Por ejemplo, una "genoteca de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos" se refiere a un conjunto de polinucleótidos que comprende dos o más polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y que tienen la diversidad que se describe en este documento. Por ejemplo, se pueden emplear las genotecas de presentación en fagos disponibles en el mercado, como por ejemplo las genotecas MorphoSys HuCAL PLATINUM®.

35 Tal y como se usa en el presente documento, el término "diversidad" se refiere a una variedad o a una heterogeneidad perceptible.

40 La expresión "región estructural" significa un dominio variable de anticuerpo según lo definido por Kabat et al. (1991) como la parte del dominio variable que sirve como una estructura para los bucles que se unen a un antígeno de ese dominio variable. Los ejemplos de las regiones estructurales incluyen FR1, FR2, FR3 y FR4 de las cadenas ligeras variables o pesadas variables.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgE, IgG, tales como IgG1 o IgG4) que está proporcionada por los genes de la región constante de la cadena pesada. El isotipo también incluye versiones modificadas de una de esas clases, en donde se han realizado modificaciones para alterar la función de Fc, por ejemplo, para mejorar o reducir las funciones efectoras o la unión a receptores de Fc.

45 Por "anticuerpo anti-idiotípico" se entiende un anticuerpo que se une específicamente a la región que se une a un antígeno de otro anticuerpo y, por lo tanto, está unido específicamente con el otro anticuerpo. El anticuerpo anti-idiotípico puede imitar el epítipo reconocido normalmente por otro anticuerpo. Un idiotipo es la variación determinada genéticamente de las estructuras en las regiones variables de las inmunoglobulinas. La base genética precisa de la variabilidad del idiotipo solo se ha explicado parcialmente. Sin embargo, la variación del idiotipo implica la secuencia de aminoácidos y la estructura proteica (los denominados determinantes), especialmente en el área de la región que se une a un antígeno, también conocida como el idiotipo. El término "idiotipo" indica el conjunto completo de determinantes de una región variable de una molécula de anticuerpo.

55 El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos de origen natural y también a los sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que actúan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los

análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina., sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúa de una manera similar a un aminoácido natural.

La expresión "ácido nucleico" se usa en este documento de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma de cadena simple o doble. El término incluye ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de la estructura principal modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también incluye implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, tal y como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o varios codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al. (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; y Rossolini et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98).

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que esos términos se refieren no solo a la célula objeto en particular, sino a la progenie de esa célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, esa progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún está incluida dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal y como se usa en este documento.

El término "vector", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo molecular utilizado para transferir material genético extraño a otra célula. El vector en sí mismo es generalmente una secuencia de ADN que consiste en un inserto (secuencia de interés) y una secuencia más larga que sirve como "estructura principal" del vector. La finalidad de un vector para transferir información genética a otra célula es, por lo general, aislar, multiplicar o expresar el inserto en la célula diana.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "flujo lateral" se refiere al flujo de líquido a lo largo del plano de un sustrato o vehículo, por ejemplo, una membrana de flujo lateral. En general, los dispositivos de flujo lateral comprenden una tira (o una pluralidad de tiras en comunicación fluida) de material capaz de transportar una solución por acción capilar, es decir, una acción de absorción o cromatográfica, en donde diferentes áreas o zonas en la o las tiras contienen reactivos del ensayo, que se unen de forma difusiva o no difusiva al sustrato, lo que produce una señal detectable a medida que la solución es transportada o migra a través de esas zonas. Normalmente, esos ensayos comprenden una zona de aplicación adaptada para recibir una muestra líquida, una zona de reactivo separada lateralmente de la misma y en comunicación fluida con la zona de aplicación, y una zona de detección separada lateralmente de la misma y en comunicación fluida con la zona de reactivo. La zona de reactivo puede comprender un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) que sea móvil en el líquido y capaz de interactuar con un analito en la muestra, por ejemplo, para formar un complejo de analito-reactivo, y/o con una molécula unida en la zona de detección. La zona de detección puede comprender una molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que está inmovilizada sobre la tira y es capaz de interactuar con el analito y/o el reactivo y/o un complejo de analito-reactivo para producir una señal detectable. Esos ensayos se pueden emplear para detectar un analito en una muestra a través de un enlace directo (ensayo de tipo sándwich) o competitivo. Ejemplos de dispositivos de flujo lateral se proporcionan en los documentos US 6.194.220. US 5.998.221 y US 5.798.273.

**Tabla 1: Secuencias**

ID DEL ANTICUERPO/ DEL NÚMERO DE SECUENCIA	REGIÓN	SECUENCIA
<b>AdaTNF#1</b>		VH1A VLk3
SEQ ID NO: 1 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTYAIS
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	WMGGIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	DYFSSIGWVVYYGPMDY

ES 2 734 130 T3

ID DEL ANTICUERPO/ID DEL NÚMERO DE SECUENCIA	REGIÓN	SECUENCIA
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSSPYLA
SEQ ID NO: 5 (Kabat)	LCDR2	LLIYDVSSRAT
SEQ ID NO: 6 (Kabat)	LCDR3	QQYTSTPP
SEQ ID NO:7	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSPYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDVSSRATGIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYCQQYTSTPPTFGQGTKVEIKRT
SEQ ID NO:8	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYAIWVR QAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYFSSIGWVWVYGPMDY WGQGLTIVTSS
SEQ ID NO:9	ADN VL	gatatcgtgctgaccagagcccgccgaccctgagcctgagcccggtgaac gtgccaccctgagctgcagagcgagccagctctgttctctccgtacctggctgg taccagcagaaccggccagcccccgcgtctattaatctacgaccttctctc gtgcgaccggcattccggcgcttttagcggcagcggatccggcaccgattca ccctgaccattagcagcctggaaccggaagacttgcgggtgattattgccagc agtacacttctactccgacccttggccagggcacgaaagtgaataaacc gtacc
SEQ ID NO:10	ADN VH	cagggtcaattggtgcagagcgggtccgaagtgaanaaccgggcagcag cgtgaaagtagctgcaaagcatccggaggagcttttctactacgctatctctt gggtgcgccaggccccggccagggcctcgagtgatggcggtatcatccc gatcttcgacactgcgaactacgccagaaattcaggggccgggtgaccattac cgccgatgaaagcaccagcaccgcctatattggaactgagcagcctgcgcag cgaagatacggccgtgattattgcgcgctgactacttctctatcggtgggtt gttactacggtccgatggattactggggccaaggcacccctgggtgactgttagct ca
<b>AdaTNF#5</b>		VH1A VLk1
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTNAIS
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	HCDR2	WMGGINPHLGHADYAQKFQG
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	HCDR3	GWYYIGSNPSMYPNYFDP
SEQ ID NO: 14 (Kabat)	LCDR1	RASQTISSYLN
SEQ ID NO: 15 (Kabat)	LCDR2	LLIYTASNLQS
SEQ ID NO: 16 (Kabat)	LCDR3	QQVLHLP
SEQ ID NO:17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYTASNLSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQVLHLPHTFGQGTKVEIKRT
SEQ ID NO:18	VH	

ES 2 734 130 T3

ID DEL ANTICUERPO/ID DEL NÚMERO DE SECUENCIA	REGIÓN	SECUENCIA
		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSTNAISWVR QAPGQGLEWMGGINPHLGHADYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGWYYIGSNPSPMPNYF DPWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:19	ADN VL	gatatccagatgaccagagcccagcagcctgagcgccagcgtggcgat cgcgtagaccattacctgcagagccagccagactattctcttacctgaactgta ccagcagaaaccgggcaaagcgcgaaactattaatctacactgcttaacc tgcaaagcggcgtgccagccgcttagcggcagcggatccggcaccgattc accctgaccattagctctctgcaaccggaagactttgcgacctattattgccagc aggtctgcatctgccgatactttggccagggcacgaaagtgaatfaaac gtacg
SEQ ID NO:20	ADN VH	Caggtgcaattggtgcagagcggcgccaagtgaaaaaccgggcagcag cgtgaaagtagctgcaaagcatccggaggacgttttclactaacgctatctct gggtgcgccaggccccgggcccaggccctcagtgatggcggtatcaacc cgcatctggccatgcggactaccccagaaattcaggggcgggtgaccatt accgccgatgaaagcaccagcaccgcclataatggaactgagcagcctgcgc agcgaagatacggccgtgtattattgcgcgctggttggactacatcggtcta accgctctatgtaccgaactctcgtatccgtggggccaaggcaccctgggta ctgttagctca
<b>IFX-TNF#1</b>		VH3-23 VLk3
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	HCDR1	GFTFSSYGMH
SEQ ID NO: 22 (Kabat)	HCDR2	WVSYIYYGSDTYADSVKG
SEQ ID NO: 23 (Kabat)	HCDR3	GMYLYDQPAFDY
SEQ ID NO: 24 (Kabat)	LCDR1	SGDNIRSDYVH
SEQ ID NO: 25 (Kabat)	LCDR2	LVYDKSERPS
SEQ ID NO: 26 (Kabat)	LCDR3	QAADTWSTIV
SEQ ID NO:27	VL	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLGDYYVHWYQQK PGQAPVLVIYADNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCQTYDDRSSPVFGGKTLTVLGQ
SEQ ID NO:28	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWV RQAPGKLEWVSGIGSYTYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLR AEDTAVYYCARLSQTGVMDYWGQGLVTV VSS
SEQ ID NO:29	ADN VL	gatatcgaactgaccagccgcccctcagtgagcgttcaccaggtcagaccg gcgfatctcgtgtagcggcgattctctgggtgattattatgctcattggtaccagcag aaaccgggagcggcggcaggtctctgtgattatgctgataataatcctccctcag gcatcccggaaacgcttagcggatccaacagcggcaacaccgagaccctga ccattagcggcactcaggcgggaagacgaagcggattattattgccagactatg atgatcgtctctcctgtttggcggcggcacgaagtaaccgtcctaggtcag

ID DEL ANTICUERPO/ID DEL NÚMERO DE SECUENCIA	REGIÓN	SECUENCIA
SEQ ID NO:30	ADN VH	cagggtcaattggtggaagcggcggcggcctgggtgcaaccggggcggcagc ctgctgtagctgctgcgcccgattaccttaattctatgctatgcttgggt gcgcaagcccctggaagggtctgagtggtgagcggtagcgtatcggtatgata cctattatcggtatagcgtgaaaggccgtttaccattcacgtgataattcgaaa aacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatacggccgtgta ttattgctgctgtcttctcagactggtgattatgggccaaggcacct ggtgacggttagctca

### Ejemplos

#### Generación de fragmentos Fab y anticuerpos que son específicos para un complejo de anticuerpo/antígeno

- 5 Para la selección de anticuerpos que reconocen específicamente el complejo de anticuerpo/antígeno se empleó una genoteca de presentación en fagos comercialmente disponible, la genoteca de MorphoSys HuCAL PLATINUM®. Dicha genoteca de anticuerpos se basa en el concepto HuCAL® (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296: 57-86) y emplea la tecnología CysDisplay® para mostrar el Fab sobre la superficie del fago (documento WO2001/05950 de Lohning). Sin embargo, cualquier otra genoteca de anticuerpos disponible sería adecuada para identificar anticuerpos específicos de complejos.
- 10 Para identificar un complejo de anticuerpo/antígeno, se han desarrollado estrategias de cribado (del inglés, “panning”) específicas de anticuerpos para dirigirse a los complejos de anticuerpo/antígeno. De este modo, se utilizó un antígeno recombinante purificado y su respectivo anticuerpo terapéutico recombinante para el cribado. De acuerdo con los ejemplos descritos a continuación, para 3 complejos diferentes de anticuerpo/antígeno, se identificaron anticuerpos que solo se unían a ese complejo específico. Todas las estrategias de cribado y los antígenos descritos se utilizaron para el proceso de selección de anticuerpos. Cada estrategia de cribado comprendía al menos 3 rondas individuales de cribado y contenía antígenos únicos, concentraciones de antígeno y lavado riguroso.
- 15

#### Ejemplo 1: Generación y caracterización de fragmentos Fab y anticuerpos que son específicos para el complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$

- 20 Para identificar anticuerpos que se unen específicamente al complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  recombinante (BioLegend 570108, Lote B137143) acoplado a perlas magnéticas y Adalimumab se utilizaron como antígenos para un enfoque de cribado en solución.

##### a) Cribado

- 25 Para el cribado en solución, TNF- $\alpha$  se acopló covalentemente a las perlas magnéticas Epoxy M-450 (Dynabeads M-450, Dynal) y la preparación de fagos de una genoteca de anticuerpos mostrados en fago se lavó y se bloqueó con Chemiblocker (Chemicon).

- 30 Para proporcionar los complejos de Adalimumab/TNF- $\alpha$ , el TNF- $\alpha$  recombinante que se había acoplado a las perlas magnéticas se preincubó con Adalimumab. Para la primera ronda de cribado, en presencia de Chemiblocker (Chemicon) y Tween/PBS, se añadieron anticuerpos en fagos a los complejos de Adalimumab/TNF- $\alpha$  en presencia de IgG1kappa humana purificada (50  $\mu$ g/mL), de suero humano al 10%, 50  $\mu$ g/ml de Rituximab (IgG1kappa) y 1  $\mu$ g/ml de TNF- $\alpha$  para adsorber todos los anticuerpos en fagos que son específicos de IgG1 kappa y TNF- $\alpha$  libre o que reaccionan de forma cruzada con cualquier componente del suero humano. Después de la incubación en un aparato rotatorio durante la noche a una temperatura de 2 a 8°C, la mezcla de fago-antígeno se transfirió a los tubos y las perlas magnéticas se capturaron utilizando un separador magnético. El material sobrenadante se retiró cuidadosamente de las perlas y las perlas restantes se lavaron con PBST.

- 35 Las siguientes rondas de cribado 2 y 3 se realizaron de manera similar con concentraciones crecientes de TNF- $\alpha$  libre (5  $\mu$ g/ml en la segunda ronda de cribado; 25  $\mu$ g/ml en la tercera ronda de cribado) para aumentar el rigor y desechar los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el TNF- $\alpha$  libre.

- 40 En cada ronda de cribado, los fagos restantes se eluyeron, y los fagos eluidos se usaron inmediatamente para la infección de bacterias E. coli TG1. Después del rescate de los fagos mediante el uso de fagos auxiliares, la producción de fagos amplificados policlonales se tituló nuevamente y se utilizó en etapas de selección consecutivas. Después de la tercera ronda de cribado, se aisló el ADN de los fagos específicos de antígeno eluidos a partir de las bacterias infectadas y se subclonó el ADN que codificaba Fab mediante PCR en vectores de expresión de Fab es-

pecíficos. Después de una transformación de las bacterias TG1-F, utilizando los vectores que codificaban Fab, se realizó la expresión de un único clon y la preparación de extractos periplásmicos que contenían fragmentos HuCAL-Fab. Se utilizaron extractos periplásmicos que contenían Fab para el escrutinio inicial y la caracterización.

5 Para una caracterización adicional, se emplearon Fab purificados. La expresión de los fragmentos Fab en células TG-1 se llevó a cabo en cultivos en matraz de agitación usando 500 ml de medio 2x YT complementado con cloranfenicol 1 mM y glucosa al 0,1%. La expresión se indujo mediante la adición de IPTG 0,75 mM durante 20 h a 30°C. Las células se rompieron utilizando un tampón de lisis que contenía lisozima, Bugbuster y Benzonasa y los fragmentos Fab se aislaron mediante cromatografía Ni-NTA (Bio-Rad, Alemania). Las concentraciones de proteína se determinaron por espectrofotometría con UV. La pureza de los fragmentos Fab se analizó en estado desnaturalizado, reducido utilizando SDS-PAGE y en estado natural mediante HP-SEC.

10 Con el fin de expresar IgGs de longitud completa, se subclonaron fragmentos del dominio variable de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) procedentes de vectores de expresión de Fab, en vectores pMORPH@\_hlg para IgG2 humana, IgG4 humana, IgG4\_Pro humana e IgG1 LALA humana.

#### b) Escrutinio

15 El escrutinio primario se realizó con ELISA. Se seleccionaron al azar 368 clones a partir de los producidos en el procedimiento de cribado descrito anteriormente y se cultivaron en las placas de ELISA de 384 pocillos. Después de una inducción de la expresión del anticuerpo (IPTG 0,75 mM durante 20 horas a 30°C) y la lisis de las células mediante el uso de lisozima, los lisados celulares que contenían los anticuerpos se analizaron en un ELISA.

20 Por lo tanto, una placa de ELISA se recubrió con los siguientes antígenos, complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$ , IgG1/kappa humana purificada procedente de la línea celular de mieloma; Rituximab y TNF- $\alpha$  recombinante libre.

En total, se identificaron 12 clones que eran positivos (la señal era al menos 5 veces mayor que el ruido de fondo) en el complejo, pero que no se unían a los otros antígenos. A continuación, se secuenciaron los 12 clones para identificar los anticuerpos únicos. Se pudieron identificar siete secuencias únicas. Estos 7 clones se expresaron y se purificaron y luego se caracterizaron.

#### 25 c) Caracterización

En primer lugar se sometieron a ensayo los 7 anticuerpos para determinar una unión específica en un ELISA frente a una serie de antígenos relacionados y no relacionados y el complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$ , en donde Adalimumab recubría la placa y TNF- $\alpha$  se sometió a ensayo para estudiar la formación del complejo o al revés. Por lo tanto, una placa de microtitulación se recubrió con 5  $\mu$ g/ml de cada uno de los antígenos durante la noche. Después de lavar y bloquear con BSA al 5%, se añadieron los anticuerpos anti-Adalimumab/TNF- $\alpha$  en formato Fab-FH (20  $\mu$ l de una solución de 2  $\mu$ g/ml). La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-His marcado con HRP y un sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu. AdaTNF#1 y AdaTNF#5 mostraron ser altamente específicos para el complejo (FIGURA 1).

35 En una etapa siguiente, AdaTNF#5 se sometió a ensayo con más detalle titulando el anticuerpo sobre diferentes antígenos inmovilizados. En el intervalo de concentración sometido a ensayo (0,03 a 2000 ng/ml), el anticuerpo se unía solo al complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$  pero no a un complejo de Infliximab/TNF- $\alpha$ , no se unía a Adalimumab no unido o a TNF- $\alpha$  libre, y no se unía a otros antígenos (FIGURA 2)

40 AdaTNF#5 se convirtió a un formato de IgG1 humana de longitud completa, se expresó en una línea celular humana y se purificó mediante cromatografía de proteína A para un análisis adicional. En primer lugar se sometió a ensayo si el anticuerpo en formato IgG1 (bivalente) todavía mostraba la misma especificidad. Una placa de microtitulación se recubrió con los antígenos a 5  $\mu$ g/ml durante la noche. Después de lavar y bloquear con BSA al 5%, se añadió AdaTNF#5-hlgG1 conjugado con HRP (20  $\mu$ l de una solución de 2  $\mu$ g/ml en tampón HiSpec). La detección se realizó utilizando el sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu®. El AdaTNF#5-hlgG1 purificado conjugado con HRP se une específicamente al complejo de Adalimumab y TNF- $\alpha$ . (FIGURA 3)

45 Para una caracterización adicional, la afinidad intrínseca monovalente de AdaTNF#5 se midió como  $K_D = 67$  nM mediante un análisis de interacción molecular exento de marcador en tiempo real, utilizando un instrumento Attana A200 sobre un complejo inmovilizado de Adalimumab-TNF- $\alpha$ . Luego se sometió a ensayo si el anticuerpo específico del complejo, AdaTNF#5, se podía usar para determinar Adalimumab añadido a suero humano. Una placa de microtitulación se recubrió con TNF- $\alpha$  humano a 5  $\mu$ g/ml y se incubó durante la noche. Después de lavar y bloquear con BSA al 5% en PBST, concentraciones crecientes de Adalimumab se añadieron a suero humano al 10% y se aplicaron a la placa recubierta previamente. Después del lavado, se añadió el anticuerpo de hlgG1, AdaTNF#5, anti-Adalimumab/TNF- $\alpha$  (conjugado con HRP) a 2  $\mu$ g/mL. La detección se realizó mediante la adición de sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu®. AdaTNF#5 se unía al complejo de Adalimumab/TNF- $\alpha$  de una manera dependiente de la dosis (FIGURA 4). Por lo tanto, esta nueva especificidad se puede usar para desarrollar ensayos de cuantificación altamente sensibles que no dependen del formato de formación puente más utilizado.

Ejemplo 2: Generación y caracterización de fragmentos Fab y anticuerpos que son específicos del complejo de Infi-

ximab/TNF- $\alpha$

Para identificar los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de Infliximab/TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  recombinante (BioLegend 570108, Lote B137143) acoplado a perlas magnéticas e Infliximab se usaron como antígenos para un enfoque de cribado en solución.

- 5 El cribado y el escrutinio se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. En el escrutinio primario, se identificaron 3 anticuerpos únicos que se unían al complejo de Infliximab/TNF- $\alpha$  y se expresaron, se purificaron y se sometieron a estudios de caracterización adicionales.

10 IFX-TNF#1, IFX-TNF#2 e IFX-TNF#3 se analizaron para determinar la unión específica en un ELISA frente a una serie de antígenos relacionados y no relacionados y el complejo de Infliximab/TNF- $\alpha$ . Para ello, una placa de microtitulación se recubrió con 5  $\mu$ g/ml de cada uno de los antígenos durante la noche. Después de lavar y bloquear con BSA al 5%, se añadieron anticuerpos anti-Infliximab/TNF- $\alpha$  en formato Fab-FH (20  $\mu$ l de una solución de 2  $\mu$ g/ml). La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-His marcado con HRP y un sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu. IFX-TNF#1 mostró que era altamente específico para el complejo (FIGURA 5).

15 Ejemplo 3: Generación y caracterización de fragmentos Fab y anticuerpos que son específicos del complejo de MOR103/GM-CSF

Para identificar los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de MOR103/GM-CSF, GM-CSF humano biotinilado recombinante y MOR103 se utilizaron como antígenos para un enfoque de cribado en fase sólida.

a) Cribado

20 De acuerdo con los procedimientos de cribado como se han descrito en el Ejemplo 1, se prepararon las preparaciones de fagos.

Para proporcionar complejos de MOR103/GM-CSF, GM-CSF recombinante se inmovilizó sobre una placa recubierta con estreptavidina y se añadió MOR103 para la formación de complejos.

25 Las 3 rondas de cribado se realizaron en presencia de 100  $\mu$ g/ml de MOR3207 (IgG1 humana específica de lisozima) y 5  $\mu$ g/ml de GM-CSF libre. Como se ha descrito en el Ejemplo 1, el ADN de los fagos aislados se subclonó en vectores de expresión de Fab y los clones respectivos se sometieron a un escrutinio primario.

b) Escrutinio

30 El escrutinio primario se realizó mediante ELISA. Se seleccionaron aleatoriamente 368 clones de los producidos con el procedimiento de cribado descrito anteriormente y se cultivaron en las placas ELISA de 284 pocillos. Después de inducir la expresión del anticuerpo (IPTG 0,75 mM durante 20 horas a 30°C) y la lisis de las células mediante el uso de lisozima, los lisados celulares que contenían los anticuerpos se analizaron en un ELISA.

Para ello, una placa de ELISA se recubrió con los siguientes antígenos, complejo de MOR103/GM-CSF, MOR3207 humano purificado (IgG1/kappa); MOR103 y GM-CSF humano recombinante libre.

35 En total, se identificaron 3 clones únicos que eran positivos (la señal era al menos 5 veces superior al ruido de fondo) sobre el complejo pero no se unían a los otros antígenos. A continuación, los clones seleccionados se expresaron y se purificaron y se analizaron para determinar la unión específica en un ELISA frente a una serie de antígenos relacionados y no relacionados y el complejo de MOR103/GM-CSF.

40 Una placa de microtitulación se recubrió con 5  $\mu$ g/ml de cada uno de los antígenos (BSA, GST, MOR03207 y MOR103) durante la noche. Para la inmovilización de GM-CSF biotinilado (GM-CSF-bio), se recubrió con Neutravidina a 5  $\mu$ g/mL durante la noche y después de bloquear con BSA al 5%, se añadió GM-CSF-bio. El complejo de MOR103/GM-CSF-bio respectivo se formó añadiendo MOR103 a 5  $\mu$ g/ml al GM-CSF-bio inmovilizado. Después de lavar y bloquear con BSA al 5%, se añadieron anticuerpos anti MOR103/GM-CSF en formato Fab que contenían un marcador 6-His C-terminal (20  $\mu$ L de una solución de 2  $\mu$ g/mL), que se detectó posteriormente utilizando un anticuerpo de detección anti-His y se cuantificó después del lavado utilizando sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu.

45 Los 3 anticuerpos (M103GmCSF#1, M103GmCSF#2 y M103GmCSF#3) detectaron específicamente el complejo de MOR103/GM-CSF pero no GM-CSF o MOR103 solos (FIGURA 6). Se observó cierta unión de M103GmCSF#1 con MOR103 pero no se pudo confirmar en un ELISA de titulación posterior.

c) Caracterización

50 M103GmCSF#1 se caracterizó adicionalmente. Una placa de microtitulación recubierta con avidina se recubrió tanto con MOR103 solo, GM-CSF biotinilado o GM-CSF biotinilado unido a MOR103. El Fab M103GmCSF#1 marcado con His se añadió en concentraciones crecientes y se detectó utilizando un anticuerpo secundario conjugado con POD específico de His y se cuantificó utilizando un sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu. M103GmCSF#1 mos-

traba una selectividad elevada para unirse al complejo de fármaco-diana y no a las proteínas individuales (fármaco y diana) (FIGURA 7). Afinidad monovalente de Fab M103GmCSF#1 hacia el complejo de fármaco-diana:  $kD = 4,9$  nM.

Ejemplo 4: Ensayo para detectar un complejo de anticuerpo/antígeno en sueros humanos usando un anticuerpo específico del complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno

5 Para realizar un seguimiento y cuantificar los complejos específicos de anticuerpos/antígenos procedentes de sueros humanos o plasma, se estableció un análisis de detección farmacocinética fuerte basado en la tecnología MSD® (Meso Scale Discovery).

En resumen, los pocillos respectivos de una placa Standard de 96 pocillos Multi-array® (Meso Scale Discovery; Cat: L11XA-3) se recubrieron con 2 µg/ml de anti-GM-CSF humano de rata disuelto en PBS.

10 Al día siguiente, MOR103 (hIgG1λ; DSM: P19292; CMC2; conc.: 2,0 mg/mL) y GM-CSF (Bayer; NDC50419-002-33 lote: B16891; conc.: 0,25 mg/mL) se diluyeron en tampón LCB (tampón LowCross, Candor Bioscience GmbH, Cat. 100500, lote nº 100C434c). Para formar los complejos de MOR103/GM-CSF, se mezclaron MOR103 y GM-CSF en una proporción de 5:1 y se complementaron con suero humano al 100% (agrupado, varones; Sigma, Cat: H4522; lote: 11M0605). Después de 1 hora de incubación, la mezcla de MOR103 y GM-CSF se diluyó 2 veces con el tampón LCB, lo que dio lugar a una concentración sérica final del 50% y se transfirió desde la placa de preincubación a la placa de 96 pocillos Multi-array® recubierta previamente y se incubó adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa del ensayo se lavó utilizando PBST y 400 ng/ml de IgG M103GmCSF#1 marcada con ECL (Lote: 110801\_11STE11\*1; marcado con ECL: Lote: 110831\_5AUN51; conc.: 1,7 mg/ml en PBS) se añadieron durante 1 h para detectar los complejos de MOR103/GM-CSF y se cuantificó posteriormente utilizando el tampón de lectura T de MSD (Cat: R92TC-1) y se midió en un MSD Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE. UU.).

A lo largo de la curva de titulación, los complejos de MOR103/GM-CSF se detectaron específicamente en presencia de sueros humanos de una forma dependiente de la dosis y con una precisión posterior a una curva ajustada de al menos 96 - 104% para cada una de las concentraciones (véase más abajo, FIGURA 8)

Muestra de calibración	Conc. nominal [pm]	Análisis por duplicado de la precisión [%]	Exactitud [%]
St01	500	2,3	100,3
St02	250	0,5	99,5
St03	125	0,4	99,5
St04	62,5	3,1	100,2
St05	31,25	3,3	100,4
St06	15,63	2,2	99,7
St07	7,81	2,8	103,7
St08	3,91	2,6	96,5
St09	1,95	4,1	97,3
St10	0,98	0	104,8
St11	0,49	20	99,8

25 Una vez que se ha descrito completamente la descripción, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no pretenden limitar adicionalmente.

30 Se considera que la memoria descriptiva expuesta anteriormente es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la descripción. Sin embargo, se apreciará que independientemente del grado de detalle con que aparece el texto anterior, la descripción se puede poner en práctica de muchas maneras y la descripción se debe interpretar de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento del mismo que se une específicamente al complejo de un anticuerpo cognado y su antígeno y no se une ni a dicho anticuerpo cognado solo ni a dicho antígeno solo, comprendiendo dicho método
- 5        (a) escrutar una genoteca de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos frente a un complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno en presencia del antígeno no unido y un anticuerpo que tiene el mismo isotipo que el anticuerpo cognado específico,
- (b) aislar dicho complejo de un anticuerpo cognado específico y su antígeno y los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos, e
- 10        (c) identificar y aislar dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el epítipo de dicho anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo incluye uno o varios aminoácidos de una región variable del anticuerpo cognado específico.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento humanizado o humano.
- 15        4. El método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo cognado específico es un anticuerpo monoclonal murino, quimérico, humanizado o humano o un fragmento del mismo.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo cognado específico o un fragmento del mismo se selecciona a partir de una lista que consiste, pero no se limita a, Adalimumab, Rituximab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab, Cetuximab, Gemtuzumab, Infliximab, Ranibizumab, Ustekinumab, Golimumab, Natalizumab,
- 20        Ofatumumab, Omalizumab, Panitumumab.
6. El método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno es una citocina o un receptor.

Figura 1

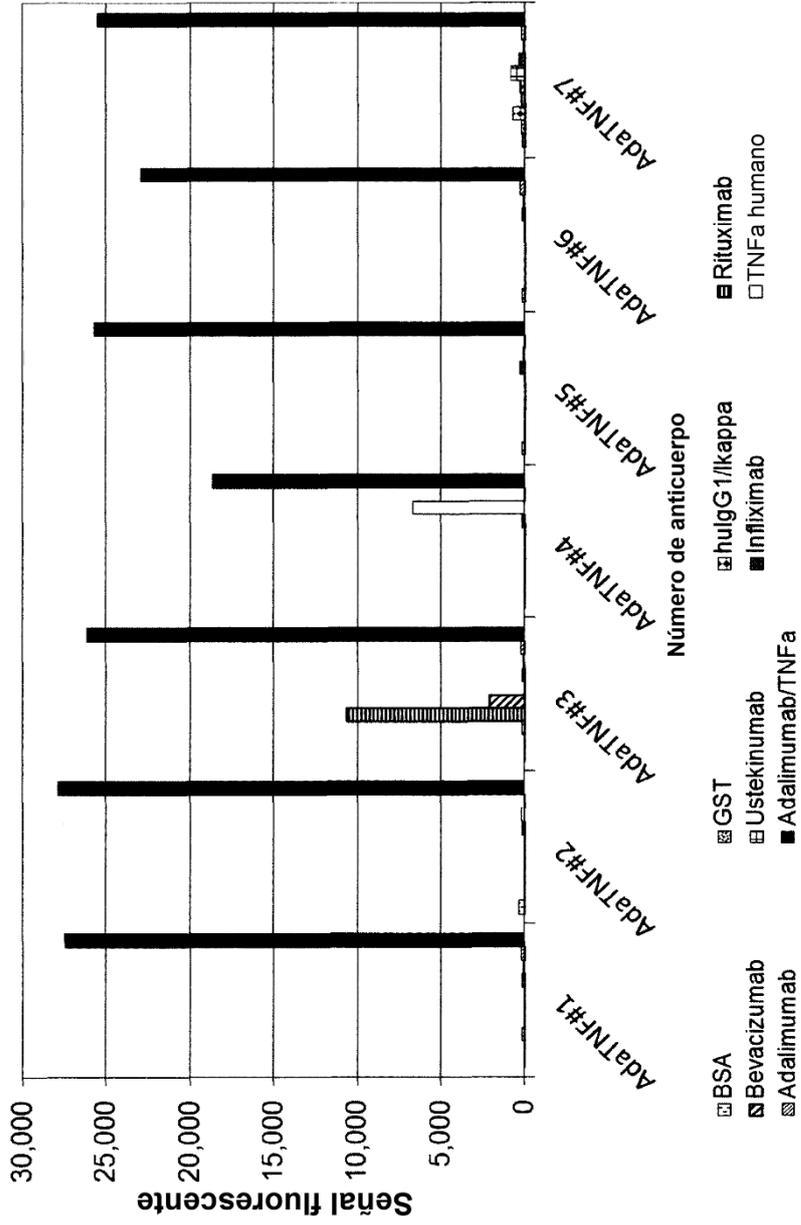


Figura 2

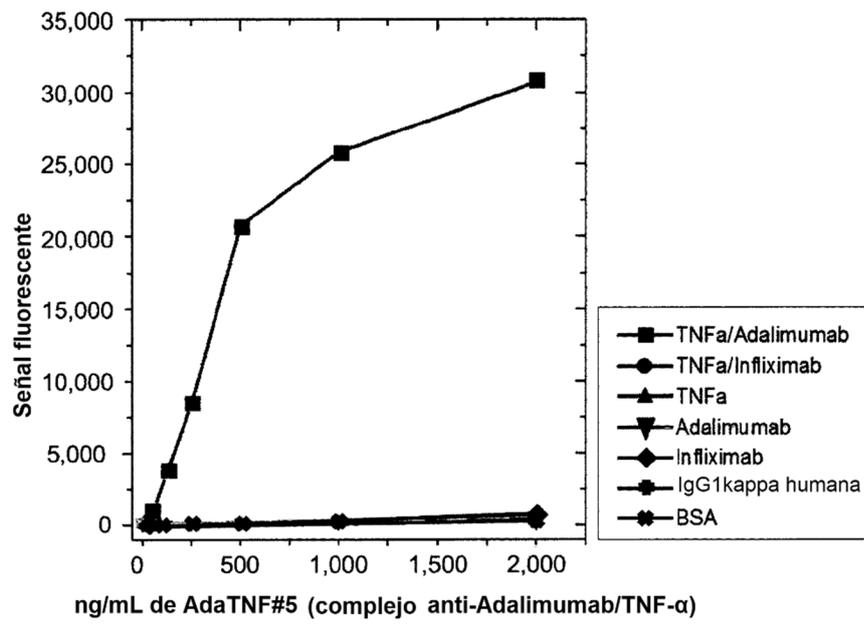


Figura 3

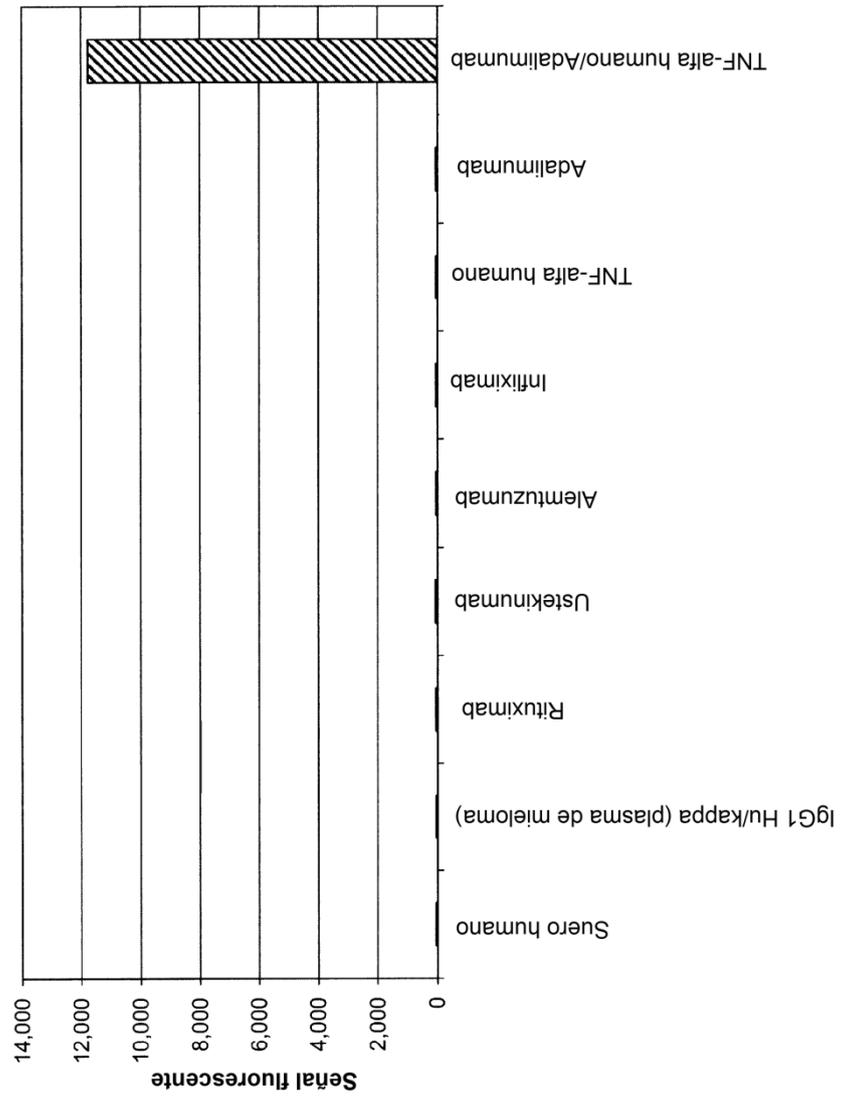


Figura 4

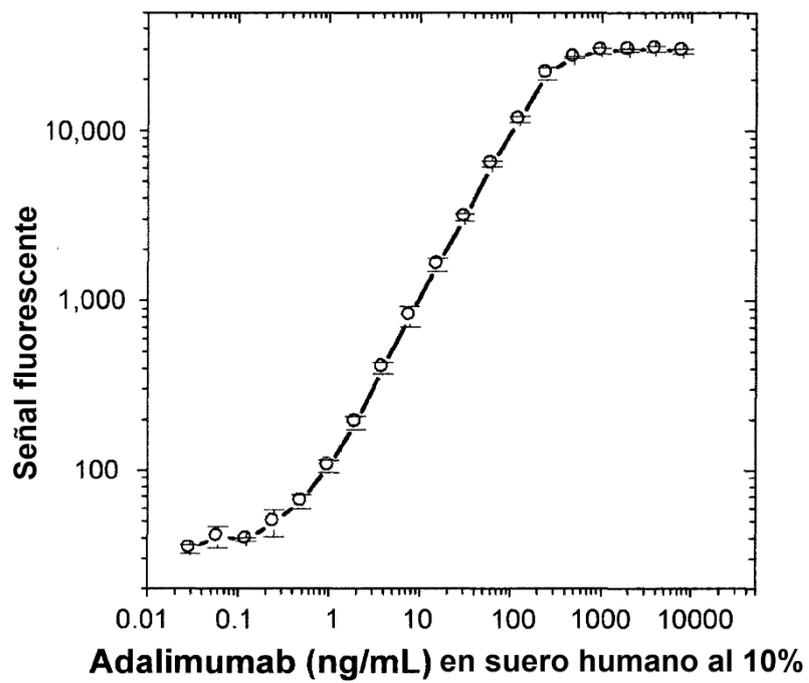


Figura 5

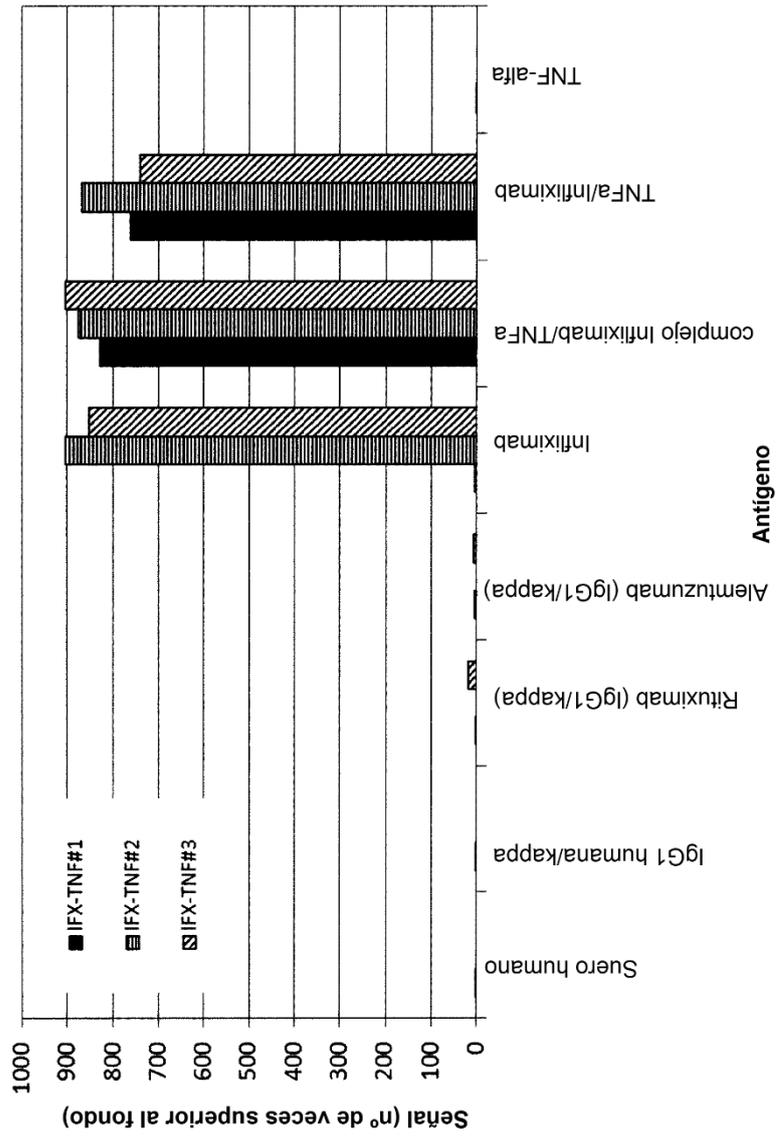


Figura 6

