

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 948**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2016 PCT/EP2016/051808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2016 E 16701800 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3250925**

54 Título: **Inmunoensayos para proteínas altamente cargadas positivamente**

30 Prioridad:

**29.01.2015 EP 15153117**

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

**09.01.2020**

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)  
Zone Industrielle de l'Ourietzaz  
1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

**BERTOTTI, ELISA y  
CASTAGNA, VALERIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 736 948 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**

Inmunoensayos para proteínas altamente cargadas positivamente

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a inmunoensayos para la cuantificación de proteínas cargadas altamente positivas, tal como la proteína FGF-18 en una muestra de fluido sinovial humano.

Antecedentes de la invención

10 Los inmunoensayos son pruebas bioquímicas que explotan la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a una molécula entre una mezcla compleja (por ejemplo, una matriz biológica). Esta capacidad se puede usar para detectar o cuantificar una molécula reconocida, el llamado analito, o viceversa; es decir, el antígeno se puede usar para capturar y permitir la cuantificación de un anticuerpo específico. El evento de enlace está asociado a la generación de una señal medible, que generalmente se compara con la señal generada por una muestra de referencia a una concentración conocida. Los primeros inmunoensayos se basaron en el marcado de anticuerpos con yodo radiactivo (RadiImmunoAssays, RIA). En los años 60, se realizaron los primeros experimentos con inmunoensayos basados en enzimas (inmunoensayos basados en enzimas, EIA, del alemán EnzymImmunoAssays o Ensayo Inmunsorbente relativo a Enzimas, ELISA, del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), que se han convertido en los más populares durante muchos años. Hoy en día se pueden usar varios tipos de marcadores, desde enzimas hasta sondas fluorescentes, ADN, etc. Además, se pueden usar reactivos sin marcar.

15 Actualmente se utilizan diferentes tecnologías de inmunoensayos, como la tecnología AlphaLISA, la tecnología Gyrolab y la tecnología Imperacer.

20 La plataforma de inmunoensayo Gyrolab es un sistema automatizado basado en microfluidos, compuesto por un sistema de tratamiento de líquidos, un sistema de detección de fluorescencia y un microlaboratorio de disco compacto (CD). El inmunoensayo se realiza en columnas de captura por afinidad incrustadas en microestructuras en el CD. Existen diferentes tipos de CD que permiten el procesamiento de diferentes volúmenes de analitos con el fin de disponer de diferentes rendimientos en términos de intervalo dinámico, sensibilidad y tipo de ensayo. En un CD hay entre 12 y 14 segmentos estando cada segmento formado por 8 microestructuras. Cada microestructura contiene un complejo sistema de nanofluidos, que permite el paso de reactivos, tampones de lavado y analitos, y termina con la columna de afinidad, preempaquetada con perlas de estreptavidina. El inmunoensayo se realiza mediante el uso de una fuerza centrífuga generada por la rotación de CD: el sistema de tratamiento de líquidos dispensa los reactivos comunes en un canal común (uno para cada segmento), mientras que las muestras se depositan en una entrada individual para evitar la contaminación cruzada. Una rotación lenta del CD permite la definición del volumen al eliminar el volumen extra utilizando el canal de desbordamiento: una barrera hidrofóbica impide el paso del fluido a la columna. Después de definir el volumen, una rotación más rápida del CD permite romper la barrera hidrofóbica y hacer que el líquido pueda fluir a través de la columna. El primer reactivo debe estar marcado con biotina para unirse a las perlas de estreptavidina. Al final del inmunoensayo (por ejemplo, un Ab secundario en un inmunoensayo de tipo sándwich) se agrega un reactivo marcado con una sonda de fluorescencia. Un láser dentro de la estación de trabajo es capaz de excitar el fluoróforo y luego que se lea la respuesta de fluorescencia. Entre las diferentes etapas de adición de reactivos hay varias etapas de lavado que hacen que el inmunoensayo sea más específico. El instrumento tiene protocolos predeterminados, pero se pueden variar muchos parámetros (composición de los tampones de lavado, número de etapas de lavado, duración de la rotación de CD) para optimizar un método que obtenga los mejores resultados. Se pueden configurar diferentes formatos de inmunoensayo (sándwich, directo, indirecto, competitivo y puente). El único requisito es la disponibilidad de un reactivo biotinilado y un reactivo marcado con una sonda de fluorescencia.

35 El documento WO2005/095457 describe un ELISA para OSM (oncostatina M) pero no un ensayo basado en columna. El documento WO2011/028945 describe un método para detectar marcadores en el fluido sinovial entre los que se encuentra el FGF-18.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para la cuantificación automática de una proteína con carga positiva alta en una muestra de líquido sinovial humano que comprende las etapas de:

- 50 a) tratar previamente la muestra de líquido sinovial humano, comprendiendo la etapa de tratamiento previo
- agregar una solución de hialuronidasa a la muestra de líquido sinovial humano,
  - incubar dicha muestra a temperatura ambiente (RT),
  - centrifugar la muestra de líquido sinovial humano,
- b) diluir la muestra de líquido sinovial humano pretratada con un tampón,

- c) inmovilizar un anticuerpo biotinilado contra la proteína con carga positiva alta en una columna,
- d) lavar la columna para eliminar el anticuerpo no unido con un tampón de lavado estándar,
- e) proporcionar un medio de inyección para la transferencia automática de la muestra de líquido sinovial humano pretratada y diluida a la columna,
- 5 f) lavar los medios de inyección con un tampón de alta fuerza iónica antes de que la muestra de líquido sinovial humano pretratada y diluida se transfiera a la columna,
- g) transferir la muestra de líquido sinovial humano pretratado y diluido a la columna, poniendo así en contacto la muestra de líquido sinovial humano pretratado y diluido con el anticuerpo biotinilado inmovilizado en condiciones en las que el anticuerpo se une específicamente a la proteína con carga positiva alta, para producir un complejo anticuerpo-proteína,
- 10 h) lavar los medios de inyección con un tampón de alta fuerza iónica después de la etapa g)
- i) lavar la columna con un tampón de lavado estándar;
- j) agregar al complejo anticuerpo-proteína en la columna un anticuerpo fluorescente marcado con un tinte específico para la proteína con carga positiva alta para producir una respuesta medible, y lavar la columna con un tampón de lavado estándar,
- 15 k) medir la respuesta producida,
- l) determinar una cantidad de la proteína cargada positivamente en la muestra comparando la respuesta producida por la muestra con la respuesta producida con un estándar de calibración, en donde la proteína cargada positivamente tiene un punto isoeléctrico de 9,5 o por encima de éste.
- 20 Breve descripción de las figuras.
- La Figura 1 muestra la reacción de Sulfo-NHS-LC-Biotina con una amina primaria. Téngase en cuenta que el NHS es un grupo saliente (subproducto) en la reacción. El grupo saliente y cualquier reactivo de biotina sin reaccionar se eliminan durante la etapa de desalinización.
- La Figura 2 muestra el gráfico de la concentración logarítmica del analito frente a los RLU obtenidos después de la incubación combinada con F05 marcado con alexa-647. Resultados medios de tres repeticiones, las barras de error muestran la SEM.
- 25 La Figura 3 muestra el gráfico de la concentración logarítmica del analito frente a los RLU obtenidos después de la incubación combinada con F44 marcado con alexa-647. Resultados medios de tres repeticiones, las barras de error muestran la SEM.
- La Figura 4 muestra el gráfico de la concentración logarítmica del analito frente a las RLU promedio obtenidas después de la incubación combinada con mAb F05 marcado con alexa-647 en 4 experimentos independientes. Resultados medios de tres repeticiones.
- 30 La Figura 5 muestra el gráfico de la concentración logarítmica del analito frente a las RLU promedio obtenidas después de la incubación combinada con F44 marcado con alexa-647 en 4 experimentos independientes. Resultados medios de tres repeticiones.
- 35 La Figura 6 muestra el análisis de las diferencias de unión entre F44 y F05. (A) Diagrama de dispersión de todos los ~4000 péptidos dentro del conjunto de datos de la matriz discontinua CLIPS. Para cada péptido, el valor ELISA obtenido para F05 y F44 se representó como una dispersión XY. Línea roja; referencia de 45°. Línea verde; LOESS ajuste por splines. Un punto de datos fue de color magenta para trazar sobre las figuras A-C. (B) datos normalizados LOESS obtenidos de la figura A. (C) Diagrama MA de la figura B. Los puntos de datos por encima o por debajo de 0,5 y ~0,5 se califican y se colorean. (D) La tabla de frecuencia de los péptidos puntuados en las líneas azul C. indicó una unión más alta para F44. Las líneas amarillas indican una unión más alta para F05.
- La Figura 7 muestra la visualización de áreas de unión en la estructura de una proteína homóloga. 21-27 es de color verde. 7-21 es de color amarillo. 153-164 es de color azul.
- 45 La Figura 8 muestra el gráfico de la concentración logarítmica del analito frente a las RLU promedio. Resultados medios de tres repeticiones, las barras de error muestran la SEM.
- La Figura 9 muestra un histograma que representa el resultado de BCC de muestras enriquecidas (SS) y muestras en blanco de líquido sinovial (SF) con varios MRD. Promedio de 3 réplicas, las barras de error representan SEM.
- La Figura 10 muestra el histograma que representa el resultado de la RLU media de las muestras de QC preparadas en Rexxip HN a tres niveles de concentración (QC-Bajo = 30 pg/mL, QC-Medio = 500 pg/mL, QC-Alto = 15000
- 50

pg/mL) con (tratada) o sin (no tratada) digestión con hialuronidasa. Promedio de 3 réplicas, las barras de error representan SEM.

#### Descripción detallada de la invención

5 Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente cualquier experto en la materia a la que pertenece el contenido del presente documento. Tal como se usa en el presente documento, las siguientes definiciones se suministran para facilitar la comprensión de la presente invención.

10 El término "comprender" se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una/uno" y "la/el" incluye las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

15 La expresión "compuesto de FGF-18", "proteína de FGF-18" o "FGF-18", como se usa en este documento, pretende ser una proteína que mantiene al menos una actividad biológica de la proteína de FGF-18 humana. La FGF-18 puede ser nativo, en su forma madura, una forma recombinante o una forma truncada de ésta. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen marcadamente el aumento en la proliferación de condrocitos u osteoblastos (ver el documento W098/16644) o en la formación de cartilago (ver el documento WO2008/023063). El FGF-18 humano nativo o natural es una proteína expresada por los condrocitos del cartilago articular. La FGF-18 humana se designó por primera vez como zFGF-5 y se describe completamente en el documento W098/16644. La SEC ID NO: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana nativa, con un péptido señal que consiste en los residuos de aminoácidos de 1(Met) a 27(Ala). La forma madura de la FGF-18 humana corresponde a la secuencia de aminoácidos del residuo 28(Glu) al residuo 207(Ala) de la SEC ID NO: 1 (180 aminoácidos). La FGF-18, en la presente invención, puede producirse mediante un método recombinante, tal como se muestra en la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de los sistemas y las condiciones de expresión, la FGF-18 en la presente invención se expresa en una célula hospedadora recombinante con un residuo de metionina (Met) de partida o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en un huésped procariota, como en E. coli, la FGF-18 contiene un residuo Met adicional en el extremo N-terminal de su secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana, cuando se expresa en E. coli, comienza con un residuo Met en el extremo N (posición 1) seguido de los residuos 28(Glu) al residuo 207(Ala) de la SEC ID NO: 1.

30 La expresión "forma truncada" de FGF18, como se usa en este documento, se refiere a una proteína que comprende o consiste en los residuos de 28(Glu) a 196(Lys) de la SEC ID NO: 1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF-18 es el polipéptido denominado "trFGF-18" (170 aminoácidos; también conocido como rhFGF18 o sprifermin), que comienza con un residuo Met (en N-terminal) seguido de los residuos de aminoácidos 28(Glu)-196(Lys) de la FGF-18 humana natural. La secuencia de aminoácidos de trFGF-18 se muestra en la SEC ID NO: 2 (los residuos de aminoácidos de 2 a 170 de la SEC ID NO: 2 corresponden a los residuos de aminoácidos 28 a 196 de la SEC ID NO: 1). La trFGF-18 es una forma truncada recombinante de la FGF-18 humana, producida en E. coli (ver documento WO2006/063362). Se ha demostrado que trFGF-18 presenta actividades similares a las de la FGF-18 humana madura, por ej. aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición de cartilago que conduce a la reparación y reconstrucción de una variedad de tejidos cartilagosos (ver documento WO2008/023063).

35 La expresión "cargado positivamente" se refiere a una proteína que contiene más aminoácidos básicos cargados positivamente (como lisina, arginina e histidina) que los aminoácidos ácidos cargados negativamente y/o se pliegan para que los aminoácidos cargados positivamente se expongan en su superficie y/o exhiban una carga positiva general al pH del medio (cuando el pH de dicho medio es más bajo que el pI, es decir, el punto isoeléctrico). Estas proteínas suelen ser básicas (el pI suele ser superior a 7). La expresión "proteína con carga positiva alta" se refiere a proteínas que son muy básicas, es decir, que tienen un alto pI, preferiblemente 9,5 aproximadamente o por encima de éste. La lisozima, FGF-2 y FGF-18, por ejemplo, son proteínas básicas, altamente cargadas positivamente. Este término es muy conocido dentro de los conocimientos usuales de las personas expertas.

40 La expresión "temperatura ambiente" se refiere a una temperatura generalmente en el intervalo de 15 a 25°C o aproximadamente en dicho intervalo, como de 15°C, 18°C, 20°C, 22°C o 25°C o aproximadamente en dicho intervalo.

45 De acuerdo con la fase del proyecto, se necesitan diferentes tipos de métodos, por ejemplo, en las fases iniciales solo se requiere una evaluación rápida y grosso modo, o se puede calificar un método. Para GLP y los estudios clínicos deben ser validados los métodos. Además, no en todos los casos se requiere la evaluación de la inmunogenicidad.

50 La medición de las concentraciones de fármaco (PK) y el anticuerpo anti-fármaco (ADA) en matrices biológicas es un aspecto importante en el desarrollo de fármacos. Los resultados de los estudios toxicocinéticos, farmacocinéticos y de bioequivalencia se utilizan para tomar decisiones críticas que apoyan la seguridad y la eficacia del propio

medicamento. Por lo tanto, es vital que los métodos bioanalíticos aplicados estén bien caracterizados, completamente validados y documentados con un estándar satisfactorio para obtener resultados confiables. Los estudios no clínicos (farmacotoxicológicos) presentados en las solicitudes de autorización de comercialización deben realizarse de conformidad con las Buenas Prácticas de Laboratorio. Los métodos utilizados en estudios preclínicos que no sean de BPL deben ser calificados, pero no necesariamente desarrollados, en una instalación de BPL y deben estar completamente validados. Los estudios bioanalíticos en humanos están fuera del alcance de las BPL, tal como se define en la Directiva 2004/10/EC, mientras que se deben seguir los principios de las Buenas Prácticas Clínicas (BPC). Las autoridades reguladoras (FDA, EMA) emitieron pautas oficiales que describen la validación de los ensayos de PK y ADA que deben seguirse para garantizar la confiabilidad de los datos producidos utilizando un método validado. Además, los libros blancos escritos por la comunidad científica están cubriendo nuevos temas que surgen en dicha temática entre diferentes ediciones de las pautas oficiales. Un ciclo de vida del ensayo se puede clasificar en 3 fases generales: desarrollo del método, validación previa al estudio y validación en el estudio. Durante el desarrollo del método, se evalúa un concepto de ensayo, que se confirmará durante la fase de validación previa al estudio y se aplicará durante la fase de validación en el estudio. La fase de validación previa al estudio se lleva a cabo una vez que se concluye la optimización del método y se considera que el ensayo es eficaz: esto significa que los reactivos de ensayo críticos deben identificarse y producirse si ello es necesario. Sobre la base de los reactivos disponibles, se elige la tecnología más apropiada, se definen el formato del ensayo y el tamaño del lote. La dilución mínima requerida (MRD) se selecciona para minimizar el efecto de la matriz y se define el intervalo del método y se confirma la sensibilidad. Las concentraciones de curva estándar y el modelo de regresión para ajustar la curva a los datos de calibración deben establecerse durante el desarrollo del método. Antes de comenzar con la fase experimental se debe producir un plan de validación. La documentación debe incluir una descripción del uso previsto del método y un resumen de los parámetros de rendimiento que se validarán, un resumen de los experimentos propuestos y los criterios de aceptación para cada parámetro de rendimiento evaluado. Después de completar el ejercicio de validación, se debe producir un informe completo. El informe resume los resultados de rendimiento del ensayo y cualquier otra información relevante relacionada con las condiciones bajo las cuales se puede usar el ensayo sin infringir los criterios de aceptación. Las características principales de un método bioanalítico que son esenciales para garantizar la aceptabilidad del rendimiento y la fiabilidad de los resultados analíticos son: selectividad, límite inferior de cuantificación, intervalo del método, función de respuesta (rendimiento de la curva de calibración), exactitud, precisión, efectos matriciales, estabilidad del analito en la matriz biológica y las soluciones de reserva y de trabajo durante todo el período de almacenamiento y las condiciones de procesamiento.

Los inmunoensayos para la cuantificación de anticuerpos contra fármacos o anti-fármacos dependen en gran medida de la calidad de los anticuerpos utilizados. Esto significa que se pueden usar diferentes tecnologías y formatos, pero el punto de partida siempre debe ser un buen par de anticuerpos. El papel de los anticuerpos en un inmunoensayo generalmente incluye reactivos de captura y detección para ensayos de PK y controles positivos para ensayos de inmunogenicidad. Cuando se consideran varios tipos de reactivos y formatos de ensayo para la misma aplicación, es aconsejable iniciar la generación de los diferentes tipos de reactivos en paralelo, lo que aumenta la probabilidad de obtener reactivos óptimos con las características apropiadas y especificadas previamente. La realización de una evaluación de riesgos adecuada brinda la oportunidad de equilibrar adecuadamente los recursos y los plazos. La mejor estrategia es considerar los objetivos del estudio en cuestión, la etapa del programa de desarrollo del fármaco, los formatos de ensayo potenciales, las especies de origen y el tipo de matrices de muestras a analizar, la sensibilidad y especificidad requeridas del ensayo, así como la potencial necesidad de reactividad del reactivo frente a múltiples analitos. Los ejemplos de información útil que se recopilarán incluyen: (a) los requisitos de sensibilidad, así como las interacciones específicas y selectivas entre un reactivo y el analito objetivo; (b) la necesidad de reducir las posibles interacciones no específicas con otros componentes del ensayo, como los anticuerpos heterofílicos y sus interacciones en los ensayos PK (c) la necesidad de reducir la reactividad cruzada potencial en la población de la muestra objetivo (por ejemplo, el factor reumatoide); (d) la necesidad de discriminación entre las isoformas de analito y sus subproductos proteolíticos; (e) el requisito para detectar analitos libres frente a aquellos en complejos más grandes; y (f) detectar anticuerpos anti-fármacos unidos al agente terapéutico con o sin tratamiento de la muestra con ácido. Cada ensayo requiere diferentes tipos de anticuerpos: por ejemplo, durante los primeros programas de descubrimiento terapéutico de MAb, se pueden usar reactivos anti-IgG genéricos, que luego pueden volverse menos deseables a medida que se generan los reactivos específicos del objetivo.

Cualquiera que sea la tecnología utilizada, sin una buena materia prima, especialmente anticuerpos, la bondad del ensayo puede verse afectada. Por esta razón, para seleccionar mejor los anticuerpos de interés, se exploró la determinación de afinidad utilizando Gyrolab y el mapeo de epítomos utilizando la tecnología CLIPS. La evaluación de las nuevas tecnologías se realizó teniendo en cuenta la fase del proyecto que intenta implementar la buena plataforma para usar en función de las necesidades específicas (por ejemplo, sensibilidad requerida, flexibilidad, facilidad de transferencia).

Gyrolab fue elegido para desarrollar un método de PK para cuantificar un fármaco altamente cargado positivamente, como una proteína FGF-18, preferiblemente sprifermin, en líquido sinovial humano. Se encontraron dos dificultades durante el desarrollo del método: alto punto isoeléctrico del analito (un fármaco) y alta viscosidad de la matriz (la muestra). El desafío fue encontrar una forma (tipo de tampón para dilución analítica, procedimiento de lavado, etc.) para ayudar a reducir los problemas relacionados con la enfermedad de la molécula y un tratamiento previo de la

muestra capaz de fluidificar la matriz sin comprometer la estabilidad del analito.

La determinación de la afinidad de los anticuerpos puede tener un gran valor para una mejor comprensión del mejor formato a utilizar, o para comprender las posibles dificultades al desarrollar nuevos inmunoensayos.

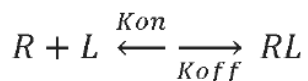
- 5 En una interacción biológica, hay dos parejas: la que tiene el peso molecular más bajo generalmente se llama ligando (L) y la pareja de unión macromolecular se llama receptor (R). En los inmunocomplejos, el anticuerpo se considera el receptor, mientras que el analito se considera el ligando. En solución, la concentración total de un receptor está formada por la fracción de receptor libre y el ligando unido (asumiendo que el receptor tiene un solo sitio de unión para el ligando, de modo que cualquier molécula sea libre o esté unida). Además, cualquier molécula de ligando debe estar libre o unida a una molécula receptora. Esto conduce a las siguientes ecuaciones de conservación de masas:

$$[R] = [RL] + [R]_f$$

$$[L] = [RL] + [L]_f$$

Donde [R] y [L] son concentraciones totales de receptor y ligando respectivamente, [R]<sub>f</sub> y [L]<sub>f</sub> son las concentraciones libres de las dos moléculas, y [RL] es la concentración del complejo receptor-ligando.

- 15 En este sistema, habrá un paso continuo de moléculas desde el estado libre al estado unido. Kon



Donde k<sub>on</sub> es la constante de velocidad de segundo orden para la asociación compleja y el K<sub>off</sub> es la constante de velocidad de primer orden para la disociación compleja.

- 20 Cuando la velocidad de asociación y de disociación del complejo se vuelven iguales, se alcanza el equilibrio. La posición de este equilibrio se cuantifica en términos de constante de disociación K<sub>d</sub>:

$$K_d = \frac{[R]_f [L]_f}{[RL]} = \frac{1}{K_a} = \frac{K_{off}}{K_{on}}$$

Las afinidades relativas de diferentes complejos receptor-ligando son inversamente proporcionales a sus valores de K<sub>d</sub>, por lo que la fuerza de unión a la misma molécula puede compararse utilizando el valor de K<sub>d</sub> para diferentes parejas de unión. La constante de asociación (K<sub>a</sub>) es la inversa de la K<sub>d</sub>.

- 25 En la mayoría de los casos, la afinidad entre un receptor y un ligando es tal que se requiere un gran exceso de ligando para efectuar una unión significativa al receptor; por lo tanto, en la mayoría de las condiciones experimentales, la formación del complejo binario se produce con un pequeño cambio en la concentración del ligando libre. Así, la reacción de asociación procede con una cinética de pseudo primer orden:

$$[RL]_t = [RL]_{eq} [1 - \exp(-k_{obs} t)]$$

- 30 donde [RL]<sub>t</sub> es la concentración del complejo binario RL en el momento t, [RL]<sub>eq</sub> es la concentración del complejo binario en el equilibrio, y k<sub>obs</sub> es el valor determinado experimentalmente para la constante de velocidad de pseudo primer orden para el enfoque al equilibrio.

Para la unión reversible, el valor de K<sub>obs</sub> es directamente proporcional a la concentración del ligando:

$$k_{obs} = k_{off} + k_{on}[L]_f$$

- 35 Por lo tanto, se puede determinar el valor de la k<sub>obs</sub> a diferentes concentraciones de ligando. Al representar la k<sub>obs</sub> como función de la concentración de ligando, se obtiene un ajuste lineal con una pendiente igual a k<sub>on</sub> y una intersección igual a k<sub>off</sub>.

La forma más común y fácil de estudiar las interacciones receptor-ligando es esperar después a que se haya establecido el equilibrio, ya que estas cinéticas generalmente ocurren en un tiempo muy corto.

- 40 En el equilibrio, la concentración del complejo RL es constante, y la velocidad de asociación y disociación compleja es igual.

$$K_d = \frac{[R]_f [L]_f}{[RL]} = \frac{K_{off}}{K_{on}} \quad \frac{d[RL]}{dt} = k_{on}[R]_f [L]_f \quad , \quad \frac{-d[RL]}{dt} = k_{off}[RL]$$

$$k_{on}[R]_f [L]_f = k_{off}[RL] \quad , \quad [RL] = \frac{K_{on}}{K_{off}} [R]_f [L]_f$$

Teniendo en cuenta que  $k_{on}/k_{off}$  es equivalente a la constante de asociación  $K_a$ :

$$[RL] = K_a [R]_f [L]_f$$

5 Hay varias técnicas que se utilizan actualmente para la medición de la afinidad; los más empleados en la bibliografía son la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), la resonancia de plasmón de superficie (SPR) y KinExA.

La tecnología Gyrolab se utilizó para evaluar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta tecnología se basa en la competencia del antígeno inmovilizado para la unión al anticuerpo de interés con cantidades crecientes de antígeno libre en el equilibrio. Solo el anticuerpo no unido al antígeno libre en solución es capturado por el antígeno inmovilizado, lo que permite la determinación de su concentración utilizando un fluoróforo (es decir, un tinte fluorescente) para la detección. De acuerdo con el procedimiento desarrollado, las etapas requeridos para la determinación de la afinidad son:

- Biotinilación del antígeno y marcaje del anticuerpo con un colorante fluorescente, por ejemplo Alexa-647,
- Investigaciones sobre las condiciones de captura,
- Determinación de la concentración fija de Ab,
- 15 • Determinación del tiempo de equilibrio de la unión.
- Confirmación de la  $K_D$  obtenida: repeticiones y variación en la concentración de Ab.

Dado que el marcado de los reactivos es una etapa crucial, el reactivo de captura (sprifermin) se marcó con diferentes proporciones de biotina y se utilizó para capturar el anticuerpo en comparación con el antígeno no marcado. Sprifermin es una proteína con carga positiva alta, por lo tanto, se observó una alta unión específica del analito a la columna (por ejemplo, columna CD de tecnología Gyrolab). Para reducir este efecto, se empleó con éxito un método modificado con etapas de lavado más estrictos. El reactivo de captura elegido fue sprifermin marcado con una relación de biotina de 1:2 a 1:20 (como 1: 2, 1:10 ó 1:20), preferiblemente una relación de biotina de 1:5 a 1:15 o incluso preferiblemente un cociente de biotina de 1:10. Una vez que se estableció el reactivo de captura (sprifermin marcado preferiblemente a 1:10), se usó para determinar la concentración fija de anticuerpo (Ab): se analizó una curva estándar de ambos anticuerpos en evaluación sin mezclarlos previamente con el antígeno libre. La elección de la mejor concentración se basó en dos factores: la concentración elegida debe haber estado en la parte lineal de la curva y la respuesta debe haber sido lo suficientemente alta como para permitir suficiente espacio para la reducción de la señal con el aumento de la concentración de antígeno en la pre-mezcla. Se han utilizado dos anticuerpos contra FGF-18: F05 y F44. Una vez marcados con el colorante fluorescente, ambos anticuerpos marcados se usaron a una concentración que varió entre 0,1 pM y 100 nM, como por ejemplo 0,1 o 0,5 pM, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 ó 100 nM. Preferiblemente, la concentración varía de 0,05 a 1 nM. La concentración incluso preferida resultó ser de aproximadamente 0,1 nM. Los dos mAbs a la concentración seleccionada se incubaron con diferentes cantidades de antígeno (que abarca desde 0,5 pM hasta 2 μM) durante 1 hora (1 h) o 24 horas (24 h). Las respuestas obtenidas después de 1 h y 24 h de incubación fueron muy similares, por lo tanto, la  $K_D$  calculada fue comparable para los dos mAbs. Argumentando que ya se alcanzó el equilibrio en este momento, todos los experimentos siguientes se realizaron con una premezcla de 1 hora, una condición favorable para acelerar todo el desarrollo. Estos datos preliminares también fueron útiles para la primera estimación de  $K_D$ . El  $K_D$  del mAb F05 resultó ser de alrededor de 1 nM, mientras que el mAb F44 parecía tener una afinidad más alta con un  $K_D$  estimado de alrededor de 200 pM. Para tener un buen cálculo de la  $K_D$ , se realizó un experimento controlado de  $K_D$  y la condición a satisfacer fue: la relación entre la concentración de mAb fija y la  $K_D$  calculada debería haber sido menor o igual a 1. En ambos casos se cumplió este requisito; la relación para F05 fue alrededor de 0,09 y para F44 fue alrededor de 0,2, abundantemente por debajo de 1.

Estos experimentos se confirmaron repitiendo 4 veces la evaluación utilizando el procedimiento desarrollado y también cambiando la concentración fija de mAb. F05 dio resultados fiables con respuestas estables y conservando la constante de afinidad estimada en alrededor 1 nM para todos los experimentos realizados de forma controlada por  $K_D$ . El F44 mostró una afinidad más alta que F05, alrededor de 300 pM, pero los resultados fueron menos reproducibles, lo que sugiere que este comportamiento puede deberse a los reactivos utilizados: con un anticuerpo de mayor afinidad, la determinación es más complicada.

El segundo aspecto abordado para evaluar la calidad de los anticuerpos fue el mapeo de epítomos. Dado que estos anticuerpos se utilizan en un inmunoensayo de tipo sándwich, los epítomos reconocidos pueden ser una información útil no solo para seleccionar el mejor par de anticuerpos sino también para la interpretación de los datos. Al conocer los epítomos exactos reconocidos por el anticuerpo, es posible evaluar la capacidad del ensayo para reconocer específicamente el fármaco intacto o los productos digeridos, información muy útil para la interpretación de los datos de PK durante el desarrollo del fármaco. El mapeo de epítomos se realizó de acuerdo con Pepscan Presto (Países Bajos). Esta tecnología fue elegida por su capacidad para reconocer no solo los epítomos lineales como las técnicas más convencionales, sino también los epítomos conformacionales y discontinuos en poco tiempo. El antígeno (sprifermin) se convirtió en una biblioteca de aproximadamente 4000 péptidos superpuestos que se probaron como tales y con mutagénesis de un solo residuo. Además, se conformaron en bucles utilizando la tecnología CLIPS: como tal, con mutagénesis y, finalmente, con la yuxtaposición de secuencias procedentes de toda la longitud de la proteína. Todos estos conjuntos de péptidos se probaron en un ELISA basado en Pepscan optimizado ad hoc para determinar las propiedades de unión de los anticuerpos utilizados. El análisis de los datos fue complicado porque los dos anticuerpos mostraron patrones de unión muy similares, pero como se usan en un ELISA de tipo sándwich, necesariamente debe haber una diferencia en los dos epítomos. Por lo tanto, los patrones de unión se analizaron en la comparación al resaltar los péptidos de unión diferencial. Se encontró una región de unión común (residuos de aminoácidos 21-27 de la SEC ID NO.2). Además, se encontró una segunda región de unión (residuos de aminoácidos 7-21 de la SEC ID NO.2 para F05 y 153-164 de la SEC ID NO.2 para F44) para ambos mAbs. Estas regiones se encuentran respectivamente en el dominio N-terminal y C-terminal de la secuencia primaria de la proteína y, según la estructura terciaria de una proteína con una alta homología de sprifermin, deben estar cerca de la región de los residuos de aminoácidos 21-27 de la SEC ID NO.2.

Se utilizaron dos anticuerpos, F05 y F44, para desarrollar un ensayo de PK para cuantificar sprifermin en líquido sinovial humano. Dado que la matriz mostró una interferencia muy alta y el volumen de muestras recolectadas de los pacientes podría ser muy limitado, se eligió Gyrolab como tecnología preferida con respecto al ELISA de sándwich ya validado para cuantificar el mismo fármaco en suero humano. La pareja de anticuerpos se probó en ambas combinaciones de captura y detección, lo que dio como resultado que F44 pudiera usarse como reactivo de captura, mientras que F05 como reactivo de detección. Este comportamiento confirma la mayor afinidad medida para F44: de hecho, el Ab más afín se usa normalmente para capturar un analito en una matriz compleja.

Un aspecto importante que los inventores debían tener en cuenta era el analito. Sprifermin es una proteína recombinante de alrededor de 20 kDa caracterizada por un punto isoelectrónico de 10.4. Eso significa que a un pH neutro la proteína está cargada positivamente. Como consecuencia, es pegajoso y tiene la tendencia de unirse a las superficies de vidrio y plástico. Por lo tanto, el tampón para la dilución de la muestra se optimizó para evitar la pérdida de analito durante la manipulación de la muestra. Se han probado diferentes tampones: Rexxip HN, Rexxip HN Max, Tampón diluyente 1 y Tampón diluyente 10. Entre estos tampones, el que tuvo los mejores resultados fue el Rexxip HN (un tampón desarrollado para analitos cargados positivamente).

El segundo tema relacionado con el desarrollo de este método fue la complejidad de la matriz. El fluido sinovial no marcado y el analito se diluyeron con diferentes MRD para encontrar la dilución óptima. Durante los experimentos realizados para encontrar el mejor MRD, los inventores experimentaron que el líquido sinovial era altamente viscoso y difícil de manipular. Además, se observó un comportamiento extraño en términos de respuesta en el ensayo: a menor dilución, mejor resultado en términos de % de CV y % de SESGO. Por estas razones, se decidió mejorar la manipulación del líquido sinovial mediante la adición de un procedimiento de tratamiento previo. Se evaluó la digestión con hialuronidasa, ya que el líquido sinovial está hecho, en particular, de ácido hialurónico. Se aplicaron condiciones suaves en términos de temperatura y duración para reducir el impacto del tratamiento en la estabilidad del analito. Después de varios ensayos, los inventores se dieron cuenta de que la digestión con hialuronidasa del líquido sinovial solo no era suficiente para reducir la viscosidad de la muestra; el taponamiento de la aguja, la contaminación de otras muestras, el % de CV malo y el % de SESGO malo se observaron en muchos experimentos realizados con diferentes concentraciones de hialuronidasa y tiempo de incubación. Por lo tanto, para mejorar el rendimiento del método, se probó una etapa de centrifugación en combinación con la digestión con hialuronidasa proporcionando buenos resultados en términos de % SESGO y % CV sin afectar a la estabilidad del analito. El procedimiento de pretratamiento de la muestra final se estableció (centrifugación dos veces a 13000 rpm durante 5 minutos e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación de 20 µg/ml de hialuronidasa) mejorando la manipulación de las muestras, aumentando la fluidez de la matriz y evitando fenómenos de taponamiento de la aguja. Después de haber establecido el tampón de dilución, el MRD y el pretratamiento de la muestra, para garantizar que el analito no se adheriera realmente al instrumento, se realizó la evaluación de la transferencia de agujas. Como era de esperar, Sprifermin todavía mostraba una alta unión a las agujas Gyrolab (debido a su alta carga positiva) incluso si se usaba Rexxip HN, lo que tuvo un impacto en la muestra enriquecida de concentrado (SS). Por lo tanto, el método se modificó agregando etapas de lavado adicionales con una solución con alto contenido de sal antes de la etapa de adición de analito. El método comprende así al menos 2 etapas de lavado: uno antes de la etapa de adición de analito y otro después de dicha etapa de adición de analito.

Se describe en este documento (pero no como parte de la invención) un método para el tratamiento previo de una muestra de fluido sinovial humano para inmunoensayo que comprende:

- agregar una solución de hialuronidasa a la muestra de líquido sinovial humano,



## ES 2 736 948 T3

- incubar dicha muestra a temperatura ambiente (RT)
- centrifugar la muestra de líquido sinovial humano.

La concentración de hialuronidasa varía de 0,1 a 30 µg/mL, como 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25 ó 30 µg/mL. Preferiblemente, oscila entre 5 y 20 µg/ml. Incluso de preferencia es de alrededor de 20 µg/mL.

- 5 El tiempo de incubación del líquido sinovial humano con la hialuronidasa es de al menos 20 minutos, preferiblemente de al menos 25 minutos e incluso preferiblemente de al menos 30 minutos. Más preferiblemente, el tiempo de incubación del fluido sinovial humano con la hialuronidasa es de 30 minutos o 1 hora. La centrifugación de la muestra de líquido sinovial humano se realiza de acuerdo con los métodos estándar. Por ejemplo, la centrifugación se puede realizar de 10.000 a 15.000 rpm, tal como a aproximadamente 13.000 rpm durante 5 a 15 minutos, preferiblemente 10 minutos.

Se describe en este documento (pero no como parte de la invención) un método para la cuantificación de una proteína con carga positiva alta en una muestra de líquido sinovial humano que comprende las etapas de:

a) tratar previamente la muestra de líquido sinovial humano, comprendiendo la etapa de tratamiento previo

- agregar una solución de hialuronidasa a la muestra de líquido sinovial humano,

- 15 - incubar dicha muestra a temperatura ambiente (RT)

- centrifugar la muestra de líquido sinovial humano.

b) diluir la muestra de líquido sinovial humano pretratada con un tampón,

c) inmovilizar un anticuerpo biotinilado contra la proteína con carga positiva alta en una columna,

d) lavar la columna para eliminar el anticuerpo no unido con un tampón de lavado estándar,

- 20 e) poner en contacto en la columna la muestra de líquido sinovial humano pretratada y diluida con el anticuerpo biotinilado inmovilizado en condiciones en las que el anticuerpo se une específicamente a la proteína con carga positiva alta, para producir un complejo anticuerpo-proteína,

f) lavar el complejo de la columna con un tampón de lavado estándar;

- 25 g) agregar al complejo anticuerpo-proteína en la columna un anticuerpo marcado con un tinte fluorescente específico para la proteína con carga positiva alta para producir una respuesta medible, y lavar la columna con un tampón de lavado estándar,

h) medir la respuesta producida,

i) determinar una cantidad de proteína con carga positiva alta en la muestra comparando la respuesta producida con la muestra con la respuesta producida con un estándar de calibración.

- 30 La invención proporciona un método para la cuantificación automática de una proteína con carga positiva alta en una muestra de líquido sinovial humano que comprende las etapas de:

a) tratar previamente la muestra de líquido sinovial humano, comprendiendo la etapa de tratamiento previo:

- agregar una solución de hialuronidasa a la muestra de líquido sinovial humano,

- incubar dicha muestra a temperatura ambiente (RT)

- 35 - centrifugar la muestra de líquido sinovial humano.

b) diluir la muestra de líquido sinovial humano pretratada con un tampón,

c) inmovilizar un anticuerpo biotinilado contra la proteína con carga positiva alta en una columna,

d) lavar la columna para eliminar el anticuerpo no unido con un tampón de lavado estándar,

- 40 e) proporcionar un medio de inyección para la transferencia automática de la muestra de líquido sinovial humano pretratada y diluida a la columna,

f) lavar los medios de inyección con un tampón de alta fuerza iónica antes de que la muestra de líquido sinovial humano pretratada y diluida se transfiera a la columna,

g) transferir la muestra de líquido sinovial humano pretratado y diluido a la columna, poniendo así en contacto la muestra de líquido sinovial humano pretratado y diluido con el anticuerpo biotinilado inmovilizado en condiciones en

las que el anticuerpo se une específicamente a la proteína con carga positiva alta, para producir un complejo anticuerpo-proteína,

h) lavar los medios de inyección con un tampón de alta fuerza iónica después de la etapa g)

i) lavar la columna con un tampón de lavado estándar;

5 j) agregar al complejo anticuerpo-proteína en la columna un anticuerpo marcado con un tinte fluorescente específico para la proteína con carga positiva alta para producir una respuesta medible, y lavar la columna con un tampón de lavado estándar,

k) medir la respuesta producida,

10 l) determinar una cantidad de la proteína con carga positiva alta en la muestra comparando la respuesta producida con la muestra con la respuesta producida con un estándar de calibración.

15 De acuerdo con la invención, la expresión "proteína con carga positiva alta" se refiere a proteínas que contienen más aminoácidos básicos cargados positivamente (como lisina, arginina e histidina) que los aminoácidos ácidos cargados negativamente y/o se pliegan para que los aminoácidos cargados positivamente sean expuestos en su superficie y/o exhiban una carga positiva general al pH del medio. Preferiblemente, la proteína con carga positiva alta es una proteína FGF-18. Más preferiblemente, la proteína FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura de FGF-18 humana, correspondiente a la secuencia que comprende o que consiste en el residuo 28(Glu) al residuo 207(Ala) de la SEC ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada de FGF-18 humana que comprende o que consiste en el residuo 28(Glu) al residuo 196(Lys) de la SEC ID NO: 1 y 3) un polipéptido que comprende o consiste en la SEC ID NO: 2. Más preferiblemente, FGF-18 es sprifermin.

20 En una realización adicional, la muestra de líquido sinovial humano pretratada se diluye de 1:2 a 1:10, preferiblemente a 1:5 o aproximadamente 1:5, con tampón Rexpix HN (etapa b) anterior).

25 En otra realización, el tampón de alta fuerza iónica es un tampón que contiene una alta concentración de sal, tal como NaCl, preferiblemente en alcohol. Preferiblemente, la concentración de sal es de al menos 1 M. Por ejemplo, el tampón de alta fuerza iónica es NaCl 1,5 M en etanol al 20%.

La centrifugación de la muestra de líquido sinovial humano (etapa a)) se realiza de acuerdo con los métodos estándar. Por ejemplo, la centrifugación se puede realizar de 10.000 a 15.000 rpm, como a aproximadamente 13.000 rpm durante 5 a 15 minutos, preferiblemente 10 minutos.

30 El tiempo de incubación del líquido sinovial humano con la hialuronidasa (etapa a) es de al menos 20 minutos, preferiblemente al menos 25 minutos e incluso preferiblemente al menos 30 minutos. Más preferiblemente, el tiempo de incubación del fluido sinovial humano con la hialuronidasa es de 30 minutos o 1 hora. La concentración de hialuronidasa varía de 0,1 a 30 µg/mL, tal como 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25 ó 30 µg/mL. Preferiblemente, oscila entre 5 y 20 µg/ml. Incluso de preferencia es de alrededor de 20 µg/mL.

35 En una realización, el tampón de lavado estándar puede ser cualquier tampón estándar conocido. Es, por ejemplo, un tampón Tween, tal como Tween 20 al 0,05% en PBS.

Se puede obtener un anticuerpo contra la proteína con carga positiva alta, como contra la proteína FGF-18 (es decir, un anticuerpo que se une específicamente a, por ejemplo, la proteína FGF-18) mediante cualquier método estándar conocido en la técnica.

40 Una columna utilizada en los métodos de la invención es cualquier columna adecuada conocida en la técnica para separar mezclas bioquímicas basándose en una interacción altamente específica, como la que existe entre el antígeno y el anticuerpo. Preferiblemente, la columna es una columna de captura por afinidad. Más preferiblemente, la columna es una columna de estreptavidina.

45 Las etapas de lavado de la columna siempre se realizan para eliminar los reactivos no unidos (anticuerpos, mezcla o proteínas). Las etapas de lavado de los medios de inyección siempre se realizan para eliminar proteínas pegajosas de carga positiva alta, como la proteína FGF-18, que puede causar arrastre en la ejecución, cuando se deben cuantificar varias muestras.

50 Un medio de inyección usado en los métodos de la invención es cualquier dispositivo de inyección adecuado para transferir muestras líquidas de un recipiente a otro recipiente, por ejemplo para transferir la muestra de líquido sinovial humano pretratada y diluida desde el recipiente de dilución a la columna. Los medios de inyección pueden ser desechables o no desechables. Por ejemplo, dicho dispositivo de inyección adecuado puede ser un sistema de pipeteo con una punta desechable o una aguja adaptada para los métodos de la invención. Específicamente, una aguja de este tipo puede ser una aguja utilizada en la estación de trabajo Gyrolab (plataforma de inmunoensayo Gyrolab).

En el marco de la cuantificación automática, se puede cuantificar simultáneamente un conjunto de muestras, o casi simultáneamente. En tal caso, se necesitará un conjunto de columnas, una por muestra de líquido sinovial humano para analizar, y cada etapa del método se repetirá. Por lo general, se puede usar el mismo medio de inyección para transferir la muestra a la columna, siempre que todas las etapas de lavado se realicen con cuidado para evitar la transferencia entre muestras. Si se utiliza un dispositivo de inyección desechable, las etapas de lavado de las etapas f) y h) no son necesarios.

Tal como se usa en el presente documento, los tintes fluorescentes son agentes colorantes orgánicos que pueden absorber la radiación ultravioleta o la luz visible y emitirlos como luz de longitud de onda más larga prácticamente sin retraso de tiempo (fluorescente). Los tintes fluorescentes dentro del alcance de esta invención son moléculas de colorante y constituyentes cromóforos (fluorocromos) de unidades moleculares más grandes, por ejemplo, cromóforos unidos a anticuerpos u otras biomoléculas. Tales colorantes fluorescentes, por ejemplo, colorantes de acridina, colorantes de cianina, colorantes de fluorona, colorantes de oxazina, colorantes de fenantridina, colorantes de rodamina se usan, por ejemplo, en análisis de fluorescencia y como sondas fluorescentes para el marcaje específico en inmunología. Cualquier experto en la técnica posee una buena perspectiva general de los tintes fluorescentes comunes y sus campos de uso, por ejemplo, como en el "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", Richard P. Haugland, Molecular Probes.

En una realización preferida, se usa el tinte fluorescente Alexa-647. Este colorante fluorescente pertenece a la familia Alexa Fluor de colorantes fluorescentes y es producido por Molecular Probes, Inc. Los espectros de excitación y emisión de la serie Alexa Fluor cubren el espectro visible y se extienden al infrarrojo. Los miembros individuales de la familia están numerados de acuerdo con sus máximos de excitación (en nm). Los tintes Alexa Fluor se sintetizan a través de la sulfonación de cumarina, rodamina, xanteno (como la fluoresceína) y tintes de cianina. La sulfonación hace que los tintes Alexa Fluor tengan carga negativa e sean hidrofílicos. Los tintes Alexa Fluor son generalmente más estables, más brillantes y menos sensibles al pH que los tintes comunes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina) de excitación y emisión comparables, y hasta cierto punto las series más nuevas de cianina.

En el contexto de la presente invención, una respuesta medible es la fluorescencia emitida por compuestos marcados (anticuerpo o proteína) y medida por cualquier método de fluorometría o espectrofluorometría conocidos en la técnica. Cuando se usa la tecnología Gyrolab, la señal de fluorescencia emitida se mide por la estación de trabajo Gyrolab, que es capaz de realizar un escaneo de la superficie de la columna, dando como resultado una respuesta numérica de la Unidad de Fluorescencia Relativa, y una imagen del pico de fluorescencia en la columna.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Tales ejemplos, sin embargo, son ejemplos de métodos para poner en práctica la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Descripción de las secuencias:

SEC ID NO.1: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo.

SEC ID NO.2: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18).

### Ejemplos

En los siguientes ejemplos, si la concentración real de la muestra está por debajo del límite inferior de cuantificación del método (150 pg/mL), se informará que está por debajo del límite inferior de cuantificación (BQL).

1. Medición de afinidad con tecnología Gyrolab.

1.1.1. Método de análisis

Para la medición de afinidad se utilizó un ensayo de anticuerpos directo. El antígeno, Sprifermin, marcado con biotina, se une a la columna CD, y el mAb marcado con alexa647 es capturado por el antígeno inmovilizado. Se requiere una etapa de premezcla del antígeno y el anticuerpo, realizado fuera del CD, en un pocillo de microplaca. Después de un tiempo definido, la mezcla se carga, y solo el anticuerpo libre es capturado por el antígeno inmovilizado. Los anticuerpos analizados son anticuerpos monoclonales (IgG) producidos contra Sprifermin por Zymogenetics y utilizados para el ensayo pre-clínico y clínico de PK. Los anticuerpos se identifican como F5A2 (referido en el texto como mAb F05) y F44A2 (referido en el texto como mAb F44).

1.1.2. Biotinilación de Sprifermin

Para la biotinilación se utilizó el kit de Pierce "EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC-Biotinilación: no-weight biotin" (nº. cat. 21327). El producto biotilado se purificó utilizando "columnas de desecación Zeba Desalt" (nº. cat. 89849) de Pierce, mientras que el grado de marcado se verificó utilizando el kit de Pierce "kit de cuantificación de biotina" (nº. cat. 25008). Los ésteres de biotina de N-hidroxisuccinimida (NHS) son el tipo más popular de reactivos de biotinilación. Las biotinas activadas por NHS reaccionan eficientemente con grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>) en tampones de pH 7-9 para formar enlaces amida estables. Las proteínas típicamente tienen muchos sitios para el

5 marcado (ver la Figura 1), incluyendo la amina primaria en la cadena lateral de los residuos de lisina (K) y el extremo N de cada polipéptido. Se encuentran disponibles varios ésteres NHS diferentes de biotina con diferentes propiedades y longitudes de brazos espaciadores. El reactivo de éster sulfo-NHS en este kit es soluble en agua, lo que permite que las reacciones se realicen en ausencia de disolventes orgánicos. Debido a que la biotina es pequeña (244 Da), puede conjugarse con muchas proteínas sin alterar sus actividades biológicas.

La biotinización se realizó según el siguiente procedimiento:

1. 200 µl de agua fría Milli-Q se añadieron a 1 mg de biotina para obtener una concentración de 9 mM;
2. El Sprifermin se llevó a una concentración de 0,1 mM (correspondiente a 2 mg/mL: peso molecular 19830). Se usa un exceso molar de 2/10/20 veces de biotina respecto al analito. Por lo tanto, se agregan 2,7/13,5/27 µl de biotina 9 mM a 120 µl de Sprifermin;
3. La mezcla se incubó durante 1 h en estado de agitación;
4. El exceso de biotina se eliminó con una columna Zeba Desalt Spin de Pierce. Esta columna es capaz de intercambiar el tampón en el que la proteína se disuelve con  $\geq 95\%$  de retención de sales y moléculas pequeñas, mientras que proporciona una recuperación de proteínas superior a 7.000 Da. Primero se centrifugó una columna durante 1 minuto a 1500 x g. Se eliminó el exceso de líquido y se cargaron 120 µl de muestra. La columna se centrifugó durante 2 minutos a 1500 x g. El flujo a través contiene la proteína marcada sin biotina libre.
5. La concentración de la muestra se midió por espectrometría leyendo a 280 nm con Nanodrop ND-1000. Se utilizó PBS como referencia.

20 Después de la biotinización, se verificó el grado de marcaje utilizando el kit de cuantificación de biotina de Pierce. HABA (ácido 4'-hidroxiazobenceno-2-carboxílico) es un reactivo que permite una estimación rápida de la relación mol/mol de biotina a proteína. El kit contiene una premezcla de HABA y avidina y un control positivo biotinado de peroxidasa de rábano picante (HRP): el HABA/Avidina.

25 La solución que contenía la proteína biotilada se añadió a una mezcla de HABA y avidina. Debido a su mayor afinidad por la avidina, la biotina desplaza el HABA y la absorbancia a 500 nm disminuye proporcionalmente. Mediante este método, se puede cuantificar una cantidad desconocida de biotina presente en una solución en un pocillo de microplaca midiendo la absorbancia de la solución de HABA-avidina antes y después de la adición de la muestra que contiene biotina. El cambio en la absorbancia se relaciona con la cantidad de biotina en la muestra por el coeficiente de extinción del complejo HABA-avidina.

Se aplicó el siguiente procedimiento:

- 30 1. Se equilibró la Premezcla HABA sin peso/Avidina a temperatura ambiente y se disolvió en 100 µl de agua milliQ;
2. Se pipetearon 160 µl de PBS en un pocillo de microplaca para cada muestra, más uno para el control positivo;
3. Se añadieron 20 µl de la solución de premezcla HABA/Avidina al PBS en cada pocillo. La microplaca se colocó en un agitador orbital para mezclar durante 2 minutos;
4. Se midió la absorbancia de la solución en el pocillo a 500 nm y el valor se registró como A500 HABA/avidina;
- 35 5. Se añadieron 20 µl de la muestra biotilada/HRP biotilada (control positivo con tasa de biotinización conocida) al pocillo que contiene la mezcla de reacción HABA/avidina y se mezclaron como se describe anteriormente;
6. La absorbancia de la solución en el pocillo se leyó a 500 nm y el valor se registró como muestra A500 HABA/avidina/biotina una vez que el valor permanece constante durante al menos 15 segundos;
- 40 7. Finalmente, los milimoles de biotina por milimol de proteína (en la muestra original) se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{mmol de proteína biotinilada por mL} = \frac{\text{conc. proteína (mg/ml)}}{\text{PM de proteína (mg/mmol)}} = \text{Calc N}^\circ. 1$$

$$\Delta A_{500} = (A_{500}H\backslash A) - (A_{500}H\backslash A\backslash B) = \text{Calc N}^\circ. 2$$

$$\frac{\text{mmol biotina}}{\text{ml mezcla de reacción}} = \frac{\Delta A_{500}}{34000 \text{ (cm de longitud del trayecto de luz)}} = \text{Calc N}^\circ. 3$$

$$\frac{\text{mmol biotina}}{\text{mmol proteína}} = \frac{(\text{Calc N}^\circ. 3) \times 10 \times \text{factor de dilución}}{\text{Calc N}^\circ. 1}$$

### 1.1.3 Marcado con Alexa-Fluor 647 de los anticuerpos.

El kit de Molecular Probes "kit de marcado de anticuerpos monoclonales AlexaFluor® 647" (Nº. cat. A20186) se usó para marcar y purificar el producto. Se usó Nanodrop 1000 para verificar el grado de marcado. Los conjugados tienen máximos de absorción y fluorescencia de aproximadamente 650 nm y 668 nm, respectivamente. El tinte reactivo Alexa Fluor 647 tiene un resto éster de succinimidilo que reacciona eficazmente con aminas primarias de proteínas para formar conjugados de tinte-proteína estables.

El marcado se realizó según este procedimiento:

1. Los anticuerpos se diluyeron a la concentración de 1 mg/ml, y luego se añadió una décima parte de tampón de bicarbonato de sodio (pH 8,3). (Se agrega bicarbonato, pH ~8,3, para elevar el pH de la mezcla de reacción, ya que los ésteres de succinimidilo reaccionan eficientemente a pH 7,5-8,5);

2. Se transfirieron 100 µl de la solución de proteína (de la etapa 1) al vial que contenía el colorante reactivo y se invirtió suavemente para disolver completamente el colorante;

3. La solución se incubó durante 1 hora a 22°C con agitación;

4. Para separar el anticuerpo marcado del producto no reaccionado, se eliminó el exceso de colorante utilizando una resina de exclusión de tamaño 30.000 PM en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, más 2 mM de azida sódica. Se colocó una columna de centrifugación en un tubo de 5 ml y se agitó la resina de purificación. Se añadió 1 ml de la suspensión a la columna y se dejó sedimentar. Luego se agregaron 500 µl. El volumen total de la suspensión es de 1,5 ml. El tampón de la columna se dejó drenar desde la columna por gravedad. Inicialmente, puede requerirse algo de presión para hacer que las primeras gotas de tampón se eluyan;

5. La columna de centrifugación se colocó en un tubo de recolección y se centrifugó durante 3 minutos a 1100 x g con un rotor de cubeta oscilante. El tampón fue descartado. La columna de centrifugación ahora está lista para purificar el anticuerpo conjugado;

6. El producto de la etapa 3 (mezcla de marcado) se añadió gota a gota en el centro de la columna de centrifugación y se dejó absorber en el lecho de gel;

7. La columna de centrifugación se colocó en el tubo de recolección vacío y se centrifugó durante 5 minutos a 1100 x g;

8. Después de la centrifugación, se recogieron aproximadamente 100 µl de proteína marcada en PBS, pH 7,2, con 2 mM de azida sódica. El tinte libre permaneció en el lecho de la columna.

Para cuantificar la relación de marcaje, se leyó la absorbancia de la solución de conjugado a 280 nm y 650 nm utilizando el instrumento Nanodrop. La concentración de proteína en la muestra se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de proteína (M)} = \frac{[A_{280} - (A_{650} \times 0,03) \times \text{Factor de dilución}]}{203'000}$$

donde 203.000 es el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) en  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  de una IgG típica a 280 nm, y 0,03 es un factor de corrección para la contribución del fluoróforo respecto a la absorbancia a 280 nm.

El grado de marcado se calculó de esta manera:

$$\text{Moles de tinte por moles de proteína} = \frac{A_{650} \times \text{Factor de dilución}}{239.000 \times \text{concentración de proteína (M)}}$$

donde 239.000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> es el coeficiente de extinción molar aproximado del colorante Alexa Fluor 647 a 650 nm. Para las IgG, el marcado óptimo está entre 3 y 7 moles del tinte Alexa Fluor 647 por mol de anticuerpo.

5 1.1.4. Investigación de reactivos de captura.

Con el fin de determinar la mejor condición experimental para el reactivo de captura (Sprifermin biotinilada), se probaron diferentes condiciones en un ensayo Gyrolab de 2 etapas. El reactivo de captura biotinilado se une a las perlas creando columnas de captura específicas de analito. Durante el proceso de ensayo, los anticuerpos marcados con alexa-647 se pasan a través de las columnas, donde el anticuerpo se captura específicamente.

10 Se utilizaron los siguientes reactivos de captura:

- Sprifermin sin marcar solo;
- Sprifermin sin marcar + albúmina de suero bovino biotinilado (Bio-BSA, Sigma, A8549) relación 1:3;
- Proporción de Sprifermin + Bio-BSA sin marcar 1:9;
- Sprifermin, marcado de biotinilación 1:2;

15 • Sprifermin, marcado de biotinilación 1:10;

- Sprifermin, marcado de biotinilación 1:20;

20 Todos los reactivos de captura se llevaron a la concentración de 0,1 mg/ml en PBS-T (Tween 20 al 0,01% en solución salina tamponada con fosfato) o en tampón Rexpix HN (Gyros, P0004996). El reactivo de detección (anti-sprifermin mAb marcado con alexa-647) se probó a las concentraciones de 5, 10 y 50 nM diluidos en tampón Rexpix F (Gyros, P0004825). El primer experimento se realizó utilizando el método Gyrolab "Bioaffy 1000 2 step C-AD wiz-v1". El segundo experimento se realizó utilizando el método de Gyrolab "Bioaffy 1000 wash x2 C-AD wiz-v1" con la adición de etapas de lavado adicionales utilizando la Solución de lavado 2 (WS2: 1,5 M de NaCl en 20% de etanol).

Resultados

25 El primer experimento para evaluar la mejor condición de captura se realizó comparando tres grados diferentes de Sprifermin biotinilado (relación de Sprifermin: biotina 1:2, 1:10, 1:20) y Sprifermin sin marcar como control negativo. El mAb de detección bajo evaluación se preparó a tres concentraciones diferentes. Los resultados de la combinación de las diferentes condiciones de captura mostraron que hay una alta señal no específica debido a la unión del medicamento a la columna capturada con estreptavidina (consulte la Tabla 1, Sprifermin sin marcar).

mAb Alexa 647 (conc. nM)	grado de biotinilación de Sprifermin 1:2	grado de biotinilación de Sprifermin 1:10	grado de biotinilación de Sprifermin 1:20	Sprifermin no marcado
AVG RLU	AVG RLU	AVG RLU	AVG RLU	
0	0,237	0,012	0,033	0,006
5	678,3	71,7	11,8	72,6
10	686,7	80,9	13,3	106,2
50	710,3	135,4	16,5	150,3

30 Tabla 1: Resultados para la investigación del reactivo de captura. Primer experimento AVG RLU: respuesta promedio de tres repeticiones.

35 Con el fin de ganar especificidad, se realizó un cambio en el método Gyrolab. Se añadió una etapa de lavado con un tampón de alta fuerza iónica (WS2) para reducir la unión no específica. El Sprifermin sin marcar se probó también en combinación con Bio-BSA para bloquear los sitios de unión libres de la columna. Los resultados del segundo experimento se muestran en la Tabla 2.

mAb Alexa 647 (conc. nM)	grado de biotilación de Sprifermin 1:2	grado de biotilación de Sprifermin 1:10	grado de biotilación de Sprifermin 1:20
	AVG RLU	AVG RLU	AVG RLU
0	0,008	0,032	-0,012
5	330,5	402,0	1,9
10	308,0	485,0	2,2
50	751,7	534,0	2,7

mAb Alexa 647 (conc. nM)	Sprifermin sin marcar	Sprifermin sin marcar + bio- BSA 1:3	Sprifermin sin marcar + bio- BSA 1:9
	AVG RLU	AVG RLU	AVG RLU
0	0,005	-0,004	0,002
5	5,8	6,2	4,3
10	9,6	11,4	5,8
50	14,4	20,0	8,5

5 Tabla 2: Resultados para la investigación del reactivo de captura. Segundo experimento. AVG RLU: respuesta promedio de tres repeticiones

10 Al utilizar el nuevo método, con las etapas de lavado de WS2, la señal específica debida a la unión de bio-Sprifermin a la columna es mayor en relación a la señal del fármaco no marcado (en la concentración de mAb marcada con alexa de 50 nM, con el primer método, la proporción entre Sprifermin marcado 1:2 y Sprifermin sin marcar es aproximadamente 5. En el segundo experimento la relación es aproximadamente 50). Las respuestas del fármaco no marcado disminuyen drásticamente del experimento 1 al experimento 2, mientras que la respuesta del fármaco marcado permanece constante. La adición de Bio-BSA no parece ayudar significativamente a la reducción de la señal específica. Al analizar los picos de las diferentes condiciones, existe una clara diferencia entre la señal generada al usar Sprifermin marcado y no marcado. La condición más interesante, en términos de forma de pico y saturación de señal, parece ser el grado de biotilación de Sprifermin 1:10.

#### 15 1.1.5. Determinación de la concentración de anticuerpos fijos (Ab)

20 Para elegir la concentración fija de mAb marcada con Alexa-647 para los experimentos de  $K_D$ , se preparó una curva estándar que abarcaba diferentes concentraciones de MAb marcado con Alexa-647 sin preincubación con el antígeno. Las diferentes concentraciones de Ab se probaron en un ensayo Gyrolab de 2 etapas "Bioaffy 1000 wash x2 C-AD wiz-v1". El reactivo de captura, Bio-Sprifermin, grado de marcaje 1:10 se utilizó a 0,1 mg/ml diluido en Rexxip HN. La curva estándar se preparó diluyendo mAb F05 marcado con Alexa a 50, 1, 0,1, 0,01, 0,005, 0,001 nM, 0,5 y 0,1 pM en Rexxip F. Y mAb F44 marcado con Alexa a 50, 10, 1, 0,01, 0,005, 0,001 nM y 0,5 y 0,1 pM en Rexxip F.

#### Resultados

25 Con el fin de establecer las concentraciones fijas de mAb que se utilizarán para los experimentos de  $K_D$ , los dos anticuerpos se prepararon a diferentes concentraciones sin preincubación con el fármaco. Después de un par de experimentos para determinar la parte lineal de la curva sigmoidal, parece que por debajo de 0,01 nM, las respuestas no son estables para ambos anticuerpos que muestran comportamientos bastante similares (consúltese la Tabla 3). El % CV resultó muy alto hasta 0,01 nM. La concentración elegida fue 0,1 nM para ambos anticuerpos.

	mAb Alexa 647 lab. F05		mAb Alexa 647 lab. F44	
Conc. Ab (nM)	AVG RLU	%CV	AVG RLU	%CV
0	1,687	140,3	2,601	88,9
0,0001	0,812	135,0	1,150	86,4
0,0005	0,456	121,1	1,077	77,4
0,001	0,355	107,8	1,226	64,1
0,005	0,616	54,7	2,217	37,8
0,01	1,1	22,1	3,9	36,2
0,1	8,8	2,3	40,0	4,7
1	69,5	1,9	483,0	7,9
10	n.a.	n.a.	735,0	1,9

Tabla 3: Resultados para el experimento de determinación de la concentración de Ab fijo F05 y F44. AVG RLU: respuesta promedio de tres repeticiones, CV%: % coeficiente de variación de tres repeticiones. En rojo: % CV fuera del criterio de aceptación ( $\pm 20\%$ )

#### 1.1.6. Determinación del tiempo de equilibrio y relación de evaluación $[Ab]/K_D$

Para elegir el tiempo de incubación correcto para los experimentos de  $K_D$ , se preparó una curva estándar que abarcaba diferentes concentraciones de Sprifermin no marcado y luego se incubó con el MAb marcado con alexa-647 fijo durante 1 hora o 24 horas y luego se probó. Las curvas estándar se probaron en un ensayo Gyrolab de 2 etapas "Bioaffy 1000 wash x2 C-AD wiz-v1". El reactivo de captura, Bio-Sprifermin, grado de marcaje 1:10, se utilizó a 0,1 mg/ml diluido en Rexpix HN. La curva estándar se preparó diluyendo Sprifermin sin marcar a una concentración final de 0,0005, 0,01, 0,05, 0,25, 0,5, 5, 50, 500, 1000 y 2000 nM. La dilución fue 1:20, realizada en un mAb F05 marcado con Alexa a 0,1 nM, en Rexpix F. Y mAb F44 marcado con Alexa a 0,1 o 0,05 nM en Rexpix F. Estas mezclas se mantuvieron en agitación, en la oscuridad durante 1 h o 24 h a 22°C.

#### 15 Resultados

La concentración de mAb elegida de 0,1 nM se preincubó con concentraciones variables de Sprifermin para elegir el tiempo de incubación preferido para la determinación de  $K_D$ . La preincubación se realizó durante 1 hora o 24 horas y luego se probó para evaluar si una incubación más corta era capaz de permitir el equilibrio de la reacción (consúltese la Figura 2 para los resultados de mAb F05).

Para el mAb F44 fueron más difíciles de obtener resultados estables, por lo tanto, se decidió disminuir la concentración fija de mAb de 0,1 a 0,05 nM. Los resultados, en términos de % SESGO no fueron óptimos, pero se confirmaron en muchos experimentos. Dado que la  $K_D$  calculada resultó ser similar después de 1 y 24 h de incubación, se decidió mantener el tiempo de incubación a 1 h (consúltese la Figura 3 para el mAb F44). Para ambos anticuerpos, la relación  $[Ab]/K_D$  resultó ser bastante inferior a 1, por lo que el experimento realizado puede decirse que está controlado por  $K_D$ , lo que permite una determinación precisa de la  $K_D$ .

#### 1.1.7. Confirmación de la $K_D$

Con el fin de confirmar los datos obtenidos, la determinación de la  $K_D$  se repitió 4 veces para cada anticuerpo siguiendo el mismo procedimiento visto en 1.1.6.

#### Resultados

Los experimentos de la  $K_D$  se repitieron 4 veces para cada anticuerpo para confirmar los resultados. Consúltese la Figura 4 para el mAb F05 y véase la Figura 5 para el mAb F44. F05 dio resultados fiables, la  $K_D$  calculada se conserva en todos los experimentos y las respuestas son estables. La  $K_D$  calculada dio como resultado aprox. 1 nM. F44 dio como resultado menos reproducibilidad, probablemente la razón esté relacionada con la baja concentración de los reactivos utilizados. Sin embargo, el mAb F44 muestra una mayor afinidad por Sprifermin que por el mAb F05, ya que la  $K_D$  calculada es aprox. 300 pM, y la gran variación en las respuestas instrumentales puede atribuirse al hecho de que esta alta afinidad es probablemente un reto para esta tecnología.



### 1.1.8. Determinación de $K_D$ a diferentes concentraciones fijas de Ab

Para establecer la bondad de la  $K_D$  calculada, se incubó Sprifermin sin marcar con varias concentraciones de mAb. Se preparó una curva estándar que abarcaba diferentes concentraciones de Sprifermin no marcado y luego se incubó con 4 MAb marcados con alexa-647 fijados durante 1 h. Las curvas estándar se probaron en un ensayo Gyrolab de 2 etapas "Bioaffy 1000 wash x2 C-AD wiz-v1".

El reactivo de captura, Bio-Sprifermin, grado de marcaje 1:10 se utilizó a 0,1 mg/ml diluido en Rexxip HN. La curva estándar se preparó diluyendo Sprifermin sin marcar a una concentración final de 0,0005, 0,01, 0,05, 0,25, 0,5, 5, 50, 500, 1000 y 2000 nM. La dilución fue realizada a una proporción 1:20 en un mAb F05 marcado con Alexa a 0,01, 0,1, 1 y 10 nM, en Rexxip F. y mAb F44 marcado con Alexa a 5, 50 pM, 0,5 y 5 nM en Rexxip F. Estas diluciones se mantuvieron en agitación, en la oscuridad durante 1 hora a 22°C.

#### Resultados

Para confirmar la fiabilidad de la  $K_D$  calculada, los dos mAb se incubaron a cuatro concentraciones diferentes con Sprifermin sin marcar (como en experimentos anteriores). Este experimento se realizó para excluir que la  $K_D$  obtenida solo podía ser válida para la concentración de Ab elegida utilizada en todos los experimentos anteriores. Para el mAb F05, las variaciones en la concentración tuvieron un bajo impacto en la  $K_D$  calculada. Solo la concentración más alta probada: 10 nM (100 veces más alta que el 0,1 nM elegido) mostró un resultado diferente, pero dado que  $[Ab]/K_D$  es 1,6, esta determinación no puede considerarse tan precisa como las otras (datos no mostrados). Lo mismo sucedió también con el mAb F44 (datos no mostrados). Sin embargo, la  $K_D$  resultó ser más alta que la obtenida en el experimento anterior, lo que confirma la hipótesis de que la mayor afinidad de este anticuerpo por su antígeno es un reto para la tecnología Gyrolab.

### 2. Mapeo de epítomos usando la tecnología Pepscan CLIPS

La tecnología Pepscan CLIPS se utilizó para la caracterización de los dos mAbs (F44 y F05) utilizados para el inmunoensayo PK para cuantificar Sprifermin en suero y líquido sinovial. El fármaco diana se convirtió en una biblioteca de alrededor de 4000 construcciones peptídicas superpuestas, utilizando un diseño de matriz combinatoria. La tecnología CLIPS permite estructurar péptidos en bucles simples, dobles o triples. En este caso se probaron bucles simples y dobles. La síntesis se realizó acoplando plantillas de CLIPS a residuos de cisteína en los péptidos. La unión de los anticuerpos a cada péptido se probó utilizando un ELISA basado en PEPSCAN. Las matrices de péptidos se incubaron con solución de anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Después del lavado, las matrices de péptidos se incubaron con una dilución 1:1000 de un conjugado de peroxidasa y anticuerpo (SBA, cat. 2010-05) durante 1 hora a 25°C. Después del lavado, se agregaron el sustrato de peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 2  $\mu$ l/ml de  $H_2O_2$  al 3%. El desarrollo del color se midió después de una hora y se cuantificó con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes.

Se sintetizaron seis conjuntos diferentes de péptidos:

Conjunto 1: Exploración de mutagénesis de un solo residuo: reemplazo sistemático de una sola posición de una secuencia de bases con cualquiera de los 19 aminoácidos naturales (aprox. 300 péptidos);

Conjunto 2: Bucles conformacionales CLIPS: péptidos CLIPS conformacionales de bucle simple, conjunto completo de 20mers con una superposición de 19 residuos (aproximadamente 150 péptidos);

Conjunto 3: Bucles conformacionales CLIPS con interrupciones de apareamientos erróneos: idéntico al conjunto 2, pero los 2 aminoácidos en la posición central están sustituidos con Ala (aproximadamente 150 péptidos);

La comparación de los resultados de los conjuntos 2 y 3 puede indicar la relevancia de una posición mutada.

Conjunto 4: Lineal: 20mers lineales superpuestos para 19 residuos (aprox. 150 péptidos);

Conjunto 5: lineal con interrupciones de apareamientos erróneos: idéntico al conjunto 4, pero los 2 aminoácidos en la posición central están sustituidos con Ala (aproximadamente 150 péptidos);

Conjunto 6: Matriz discontinua CLIPS: una matriz de 26 x 154 17mers con una superposición de 16 residuos.

Está modelado en una estructura T3 CLIPS (aprox. 4000 péptidos);

Con el fin de optimizar las condiciones de unión, se realizó un diseño experimental con concentraciones variables del anticuerpo, la composición del tampón diluyente y el tratamiento previo de la matriz.

#### Resultados

Para resaltar los mejores péptidos de unión, una herramienta estadística que se puede usar es el método de diagrama de caja. La distribución de los resultados muestra un nivel de fondo común, y permite la determinación de valores atípicos estadísticos: péptidos con una mayor unión estadísticamente relevante entre el ruido, lo que podría

indicar posibles péptidos de unión. Usando el análisis de la gráfica de caja, las mejores condiciones para resaltar la unión específica dieron como resultado una concentración de anticuerpo a 5 µg/mL con 1% de proteínas competitivas en el tampón de bloqueo.

5 El análisis de los péptidos lineal y CLIPS indica que ambos anticuerpos tienen un patrón de unión similar, con una unión más alta en el término N y C. El análisis de la matriz CLIPS discontinua mostró patrones de unión específicos para los 2 anticuerpos. La siguiente numeración de aminoácidos se basa en la SEC ID NO.2. Tanto para F05 como para F44, las regiones de unión dominantes observadas fueron 21-27 y 36-45. La unión por F44 también se observó en las regiones 121-129, 141-151 y 153-163. Estas dos regiones también mostraron cierta unión para F05, pero en un grado mucho menor. Se demostró que F05 también se unía al extremo N-terminal 1-21.

10 Para aclarar las diferencias de unión entre los dos anticuerpos, se compararon los valores de este conjunto de datos: cada valor de respuesta se representó en una gráfica de dispersión por pares. Si para un péptido la unión es mayor para un anticuerpo con respecto al otro, esta nube de puntos no estaría centrada en una línea 1:1. Como el enlace general para F44 es mayor que para F05, la nube de puntos no está centrada en una línea 1:1 (Consúltese la Figura 6A). Para ajustar la unión general y centrarse en las diferencias específicas entre las dos muestras, la nube de puntos se normalizó utilizando un ajuste de curva LOESS (Consúltese la Figura 6B). Después de la normalización, la nube de puntos se centra aprox. 1:1. Para identificar los péptidos de unión de forma diferencial, los datos de la Figura 6B se vuelven a ajustar en un gráfico MA (un tipo de gráfico que muestra el valor medio de dos muestras en el eje X y el log<sub>2</sub> de la diferencia en el eje Y). En esta gráfica, los péptidos de unión diferencial son aquellos con un alto valor Y. Para eliminar el ruido, se puede aplicar un corte tanto para la unión media como para la diferencial. Los péptidos de unión diferencial restantes son de color azul (unión más alta en F44) y amarillo (unión más alta en F05) en la Figura 6C. Los 218 péptidos identificados (de 4000) se puntuaron según las posiciones de secuencia en la proteína diana (Figura 6D). Se observa una clara unión aumentada para F44 para péptidos que cubren la región 153-164. Para F05, la unión relativa alta se observa principalmente para 7-21.

25 Ambos anticuerpos muestran una unión más fuerte a la región 21-27, lo que sugiere que esta región es el epítipo para F05 y F44. Sin embargo, la evidencia secundaria muestra que los dos anticuerpos tienen diferentes epítopos, ya que se pueden usar juntos en un experimento de 'sándwich-ELISA'. El análisis diferencial entre F05 y F44 sugiere una unión específica por F05 en el dominio N-terminal y una unión por F44 en el dominio C-terminal. Ambos dominios están cerca de la región de unión dominante. Estos resultados se pueden visualizar como en la Figura 7, utilizando una proteína que pertenece a la misma familia de Sprifermin.

30 Los supuestos epítopos para F05 y F44 son por lo tanto:

F05: 21-27 junto con 7-21

F44: 21-27 junto con 153-164

### 3. Desarrollo de un ensayo basado en Gyrolab para PK (farmacocinética) con analito y matriz

#### 3.1. Búsqueda de la mejor combinación de anticuerpos

35 Para determinar la mejor combinación de pares de anticuerpos, se probaron dos condiciones diferentes en un ensayo Gyrolab de 3 etapas: "Bioaffy 1000 wiz v1 mod wash" con la adición de la Solución de lavado 2 (WS2: 1,5 M NaCl en 20% de etanol). Se preparó una curva estándar (std) del analito, Sprifermin, con diluciones independientes en tampón REXXIP HN (Gyros, P0004996) a 50, 10, 2 ng/mL, 400, 80, 16, 3,2 pg/mL. Se agregó una muestra en blanco (Estándar 0, "STD0", solo REXXIP HN). Los reactivos de captura (anticuerpos F44 y F05, marcados con biotina) se utilizaron a una concentración de 0,1 mg/ml. El reactivo de detección (F44 y F05 marcado con alexa-647) se usó a la concentración de 25 nM diluido en tampón REXXIP F (Gyros, P0004825).

#### Resultados

45 Para decidir la combinación de anticuerpos óptima para este ensayo de PK, se probaron las combinaciones de los dos mAbs (F05 como captura/F44 como detección y F44 como captura/F05 como detección) utilizando un método de Gyrolab de 3 etapas "Bioaffy 1000 wiz v1 mod wash" con la adición de la Solución de lavado 2 (véase la Figura 8). Este experimento se repitió 3 veces, también con variaciones en las concentraciones de los anticuerpos de detección (datos no mostrados). La mejor combinación resultó ser la de F44 como captura y F05 como detección: esta disposición de unión produjo picos con una forma más nítida y demostró permitir una mejor linealidad también en la parte inferior de la curva (datos no mostrados).

#### 50 3.2. Elección del tampón

La elección del tampón para la dilución del analito es crucial para el rendimiento del inmunoensayo. Se utilizaron cuatro tampones diferentes para la preparación de una curva estándar de Sprifermin y se analizaron de acuerdo con el procedimiento de la tecnología AlphaLISA:

- tampón REXXIP HN (Gyros, P0004996);

## ES 2 736 948 T3

• tampón REXXIP HN MAX (Gyros, P0004997);

• tampón de diluyente 1 (0,1% de albúmina de suero bovino (Sigma, número de catálogo A7906), 0,05% de Lutrol (BASF, nº de cat. S30101) en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,3);

5 • tampón de diluyente 10 (1% de albúmina de suero bovino (Sigma, número de catálogo A7906), 0,5% de Lutrol (BASF, nº de cat. S30101) en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,3).

La curva STD se preparó a 20, 5, 1 ng/mL, 200, 50, 25, 10 pg/mL (concentración final en el pocillo). Se añadió una muestra en blanco (STD0, solo tampón). El reactivo de captura, F44 marcado con biotina, se usó a una concentración de 0,1 mg/ml. El reactivo de detección, F05 marcado con alexa-647, se utilizó a la concentración de 25 nM diluido en tampón REXXIP F (Gyros, P0004825).

### 10 Resultados

El mejor tampón resultó ser REXXIP HN, un reactivo comercial que contiene agentes para neutralizar los anticuerpos heterofílicos, con un aumento de la fuerza iónica para los analitos cargados positivamente, como lo es Sprifermin. La curva estándar preparada en REXXIP HN tenía mejor exactitud (véase Tabla 5) y precisión (véase Tabla 4) hacia las otras curvas.

concentración nominal de Sprifermin pg/ml	REXXIP HN		DB 10		DB 1		REXXIP HN MAX	
	AVG RLU	% CV	AVG RLU	% CV	AVG RLU	% CV	AVG RLU	% CV
0	0,191	1,1	0,136	<u>24,6</u>	0,110	20,3	0,163	<u>36,8</u>
10	0,414	3,6	0,372	<u>124,3</u>	0,129	<u>30,4</u>	0,490	3,0
25	0,637	8,9	0,131	<u>26,2</u>	0,237	<u>77,0</u>	1,091	11,6
50	1,16	11,7	0,18	5,7	0,20	19,0	2,16	9,6
200	4,65	17,7	0,44	<u>27,9</u>	0,61	17,7	3,36	<u>22,8</u>
1000	20,9	5,5	2,1	<u>30,9</u>	2,4	13,7	16,2	9,3
5000	93,3	1,0	12,3	<u>30,5</u>	16,7	5,7	63,4	7,1
20000	329	2,6	67	<u>34,0</u>	84	7,4	237	11,9

15

Tabla 4: Tabla resumen del experimento para la selección del tampón. AVG RLU: respuesta promedio de tres repeticiones, % CV: precisión de tres repeticiones. Subrayado: % CV fuera de los criterios de aceptación ( $\pm 20\%$ )

concentración nominal de Sprifermin pg/ml	REXXIP HN		DB 10		DB 1		REXXIP HN MAX	
	AVG BCC pg/ml	% SESGO	AVG BCC pg/ml	% SESGO	AVG BCC pg/ml	% SESGO	AVG BCC pg/ml	% SESGO
10	11,2	12,0	253,5	<u>2434,5</u>	32,5	<u>225,0</u>	7,6	-24,4
25	23,4	-6,5	30,4	<u>21,6</u>	71,4	<u>185,5</u>	36,6	<u>46,4</u>
50	51,5	3,1	65,2	<u>30,4</u>	56,6	13,1	95,6	<u>91,2</u>
200	207,5	3,8	217,0	8,5	242,0	<u>21,0</u>	168,7	-15,7
1000	1043,7	4,4	1052,3	5,2	904,7	-9,5	1059,3	5,9
5000	4783,3	-4,3	5423,3	8,5	5080,0	1,6	4963,3	-0,7
20000	20366,7	1,8	16100,0	-19,5	20250,0	1,3	20050,0	0,3

20 Tabla 5: Tabla resumen del experimento para la selección del tampón. AVG BCC: promedio de la concentración calculada de nuevo de tres repeticiones, % SESGO: exactitud de BCC. Las regresiones de la curva estándar se

obtuvieron utilizando  $1/y^2$  ponderado autoestimado Xlfit (IDBS) logístico. fórmula 201. Subrayado: % SESGO fuera de los criterios de aceptación ( $\pm 20\%$ )

### 3.3. Dilución mínima requerida (MRD)

5 Una vez que el método hubo sido optimizado en tampón, se tradujo en una matriz. Para este propósito se realizó un experimento siguiendo el procedimiento de la tecnología Gyrolab. La curva estándar preparada en REXXIP HN se utilizó para cuantificar el analito preparado en líquido sinovial humano agrupado (Sera Laboratories International) en las siguientes concentraciones: 0,5, 1, 2, 5 y 10 ng/ml y luego se diluyó respectivamente 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100. En paralelo, la matriz en blanco se trató de la misma manera antes de la prueba.

#### Resultados

10 Con el fin de configurar el MRD que se iba a aplicar para el análisis de muestras, las muestras preparadas en líquido sinovial humano agrupadas se analizaron contra una curva estándar preparada en REXXIP HN. Al realizar el primer experimento con líquido sinovial, la matriz resultó ser muy viscosa y difícil de pipetear; además, debido a la alta viscosidad, también era capaz de causar cierto taponamiento en la aguja. Por estas razones, el resultado de los experimentos realizados para encontrar el MRD no fue satisfactorio en términos de exactitud y precisión: el % CV fue alto para la dilución 1:10 (Consúltese la Tabla 6 y la Figura 9), y el % SESGO fue aceptable para un MRD inferior (1:5 y 1:10) pero no para diluciones altas. Por este motivo, se decidió mejorar la manipulación del líquido sinovial mediante la adición de una etapa de tratamiento previo de la matriz antes de la MRD.

15

Conjunto SF acumulado (concentración final 100 pg/mL) (Criterios Acc.: % SESGO  $\pm 20\%$ )

	MRD 1:5	MRD 1:10	MRD 1:20	MRD 1:50	MRD 1:100
AVG BCC pg/mL	112,0	115,9	128,7	123,7	127,7
%SESGO	12,0	15,9	<u>28,7</u>	<u>23,7</u>	<u>27,7</u>
%CV	5,4	<u>25,6</u>	2,5	1,2	7,1

20 Conjunto SF en blanco, criterios de aceptación: todos BQL

	MRD 1:5	MRD 1:10	MRD 1:20	MRD 1:50	MRD 1:100
replica 1 BCC pg/mL	BQL	<u>13,4</u>	<u>44,8</u>	BQL	<u>11</u>
replica 2 BCC pg/mL	<u>10</u>	<u>10,8</u>	<u>30,1</u>	BQL	BQL
replica 3 BCC pg/mL	BQL	<u>11,6</u>	<u>34,5</u>	BQL	BQL

25 Tabla 6: Tabla resumen del experimento para el MRD. AVG BCC: promedio de la concentración calculada de nuevo de tres repeticiones, % SESGO: exactitud de BCC. % CV: precisión de tres repeticiones. BQL = Por debajo del límite inferior de cuantificación. La regresión de la curva estándar se obtuvo utilizando  $1/y^2$  ponderado autoestimado Xlfit (IDBS) logístico. fórmula 201. Subrayado: resultados fuera de los criterios de aceptación.

### 3.4. Tratamiento previo matricial

Con el fin de reducir la viscosidad de la matriz, se establecieron una etapa de centrifugación y una digestión con hialuronidasa.

#### 3.4.1. Digestión con hialuronidasa

30 Se diluyó una solución madre de hialuronidasa (tipo hialuronidasa de Bovine Testes Sigma, H3506) en PBS que contenía BSA al 0,01% a una concentración de 200 y 2  $\mu\text{g/ml}$ . Estas soluciones se agregaron a tres muestras: 1) líquido sinovial en blanco, 2) líquido sinovial con la adición del analito a 1000 pg/mL (concentración final 100 pg/mL), y 3) líquido sinovial con la adición del analito en 200 pg/mL (concentración final 40 pg/mL). Estas muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Al final de la incubación, las muestras se diluyeron 1:5 ó 1:10 en REXXIP HN y se analizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo 3.1.

35

#### Resultados

Como se muestra en la Tabla 7, se obtiene una mejora de los resultados al digerir el líquido sinovial con hialuronidasa solo para la dilución 1:5, tanto para muestras en blanco como para muestras enriquecidas. Entre las dos concentraciones de hialuronidasa probadas, la mejor fue 10  $\mu\text{g/ml}$ . Este tratamiento produjo un porcentaje de

## ES 2 736 948 T3

sesgo muy bajo para la muestra enriquecida, pero la mejora real se refiere a las muestras en blanco, ya que casi todas las muestras tratadas fueron BQL, en contraste con los resultados mostrados anteriormente (Consúltense la Tabla 6).

Criterios Acc. muestras control de SF diluidas 1:10: todos BQL			Criterios Acc. SS 1000 pg/ml en SF neto, diluido 1:10 (final en conc. pocillo 100 pg/ml): %SESGO $\pm$ 20			
Sin tratamiento	Hial 0,1 $\mu$ g/ml	Hial 10 $\mu$ g/ml	Sin tratamiento	Hial 0,1 $\mu$ g/ml	Hial 10 $\mu$ g/ml	
BQL	<u>11,4</u>	BQL	183	150	158	replica 1 BCC pg/mL
BQL	BQL	BQL	189	153	186	replica 2 BCC pg/mL
21,5	BQL	BQL	188	163	173	replica 3 BCC pg/mL
			186,7	155,3	172,3	AVG BCC pg/mL
			<u>86,7</u>	<u>55,3</u>	<u>72,3</u>	%SESGO

Criterios Acc. muestras control de SF diluidas 1:5: todos BQL			Criterios Acc. SS 200 pg/ml en SF neto, diluido 1:5 (final en conc. pocillo 40 pg/ml): %SESGO + 20			
Sin tratamiento	Hial 0,1 $\mu$ g/ml	Hial 10 $\mu$ g/ml	Sin tratamiento	Hial 0,1 $\mu$ g/ml	<b>Hial 10 <math>\mu</math>g/ml</b>	
<u>11</u>	BQL	BQL	64,4	66,1	<b>39,5</b>	replica 1 BCC pg/mL
<u>16,6</u>	BQL	BQL	65,5	46	<b>43,4</b>	replica 2 BCC pg/mL
BQL	BQL	BQL	55,6	<u>BQL</u>	<b>42,7</b>	replica 3 BCC pg/mL
			61,8	56,1	<b>41,9</b>	AVG BCC pg/mL
			<u>54,6</u>	<u>40,1</u>	<b>4,7</b>	%SESGO

5

Tabla 7: Tabla resumen del experimento para la digestión del líquido sinovial. 0,01 % BSA = muestras tratadas sin hialuronidasa, Hyal 0,1  $\mu$ g/ml = muestras tratadas con la menor concentración de hialuronidasa, Hyal 10  $\mu$ g/mL = muestras tratadas con la mayor concentración de hialuronidasa. AVG BCC: promedio de la concentración calculada de nuevo de tres repeticiones, % SESGO: precisión de BCC. BQL = Por debajo del límite inferior de cuantificación. La regresión de la curva estándar se obtuvo utilizando  $1/y^2$  ponderado autoestimado Xlfit (IDBS) logístico. Fórmula 201. Subrayado: resultados fuera de los criterios de aceptación.

10

### 3.4.2. Centrifugación

Se prepararon tres muestras enriquecidas que contenían el analito utilizando líquido sinovial humano combinado a las concentraciones de 75, 2,5 y 0,15 ng/mL (concentración final en el pocillo, respectivamente, 15000, 500 y 30 pg/mL) y se centrifugaron dos veces a 13000 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación, las muestras se diluyeron 1:5 en Rexxip HN y se analizaron utilizando una curva estándar preparada en tampón Rexxip HN (Gyros, P0004996) a 20, 10, 5, 1 ng/mL, 200, 50, 20 pg/mL (concentraciones finales en pocillo). Se agregó una muestra en blanco (STD0, solo Rexxip HN). Se procesó una matriz en blanco de la misma manera. El experimento se realizó siguiendo el procedimiento de la tecnología AlphaLISA.

15

### 20 Resultados

Como se muestra en la Tabla 8, las etapas de centrifugación no mejoraron el % de SESGO de las muestras enriquecidas analizadas después del MRD seleccionado 1:5. Todas las muestras fueron sobreestimadas, sin

embargo, las muestras después de la centrifugación fueron más fáciles de manejar que las muestras tratadas solo con hialuronidasa. Por este motivo se decidió combinar los dos tratamientos previos.

BLANCO SF	SS 30 pg/ml	SS 500 pg/ml	SS 15000 pg/ml	
BQL	34,1	748	ALQ	replica 1 BCC pg/mL
BQL	53,4	723	ALQ	replica 2 BCC pg/mL
BQL	44,3	931	ALQ	replica 3 BCC pg/mL
n.a.	43,9	800,7	n.a.	AVG BCC pg/mL
n.a.	46,4	60,1	n.a.	% SESGO

5 Tabla 8: Tabla resumen del experimento para la centrifugación del líquido sinovial. AVG BCC: promedio de la concentración calculada de nuevo de tres repeticiones, % SESGO: exactitud de BCC. BQL = por debajo del límite inferior de cuantificación. ALQ = Por encima del límite de cuantificación. La regresión de la curva estándar se obtuvo utilizando  $1/y^2$  ponderado autoestimado Xlfit (IDBS) logístico. Fórmula 201.

### 3.4.3. Digestión con Hialuronidasa + centrifugación

10 Se prepararon tres muestras enriquecidas y una muestra en blanco utilizando una mezcla de líquido sinovial humano a las concentraciones de 75, 2,5 y 0,15 ng/mL (concentración final en el pocillo, respectivamente, 1500, 500 y 30 pg/mL) y se centrifugaron dos veces a 13000 rpm durante 5 minutos. Una solución de 200 µg/ml de hialuronidasa en BSA al 0.01% que contenía PBS se diluyó 1:20 en estas muestras enriquecidas y se incubó durante 30 s a temperatura ambiente con agitación. Al final de la incubación, las muestras se diluyeron 1:5 en Rexpix HN y se analizaron utilizando una curva estándar preparada en tampón Rexpix HN (Gyros, P0004996) a 20, 10, 5, 1 ng/mL, 15 200, 50, 20 pg/mL (concentraciones finales en pocillo). Se agregó una muestra en blanco (STD0, solo Rexpix HN). Se procesó una matriz en blanco de la misma manera. La experimento se realizó siguiendo el procedimiento de la tecnología AlphaLISA.

#### Resultados

20 La combinación de centrifugación más digestión enzimática dio mejores resultados para todas las concentraciones analizadas, excepto para la SS baja que no fue cuantificable (por debajo de 20 pg/mL, que fue el punto de curva estándar más bajo; consúltese la tabla 9). En este punto, el pretratamiento seleccionado fue el siguiente:

- Centrifugación de la muestra dos veces a 13000 rpm durante 5 minutos;
- Digestión con hialuronidasa: 30 s, TA en agitación con 10 µg/ml de hialuronidasa
- MRD 1:5 en Rexpix HN

SF BLANCO	SS 30 pg/mL	SS 500 pg/mL	SS 15000 pg/mL	
BQL	BQL	585	18100	réplica 1 BCC pg/mL
BQL	BQL	602	13500	réplica 2 BCC pg/mL
BQL	BQL	561	16500	réplica 3 BCC pg/mL
n.a.	n.a.	583	16033	AVG BCC pg/mL
n.a.	n.a.	16,5	6,9	% SESGO

25 Tabla 9: Tabla resumen del experimento para el tratamiento doble del líquido sinovial. AVG BCC: promedio de la concentración calculada de nuevo de tres repeticiones, % SESGO: exactitud de BCC. BQL = por debajo del límite inferior de cuantificación. La regresión de la curva estándar se obtuvo utilizando  $1/y^2$  ponderado autoestimado Xlfit (IDBS) logístico. Fórmula 201.

### 30 3.4.4. Impacto del tratamiento en el analito.

Se prepararon tres controles de calidad en tampón a las concentraciones de 150, 1500 y 75000 pg/mL (concentraciones finales, respectivamente, 30, 300, 15000 pg/mL). La mitad de la preparación se diluyó 1:5 en Rexpix HN, y la otra mitad se incubó durante 30 s a 22°C con 10 µg/ml de hialuronidasa.

Resultados

Con el fin de verificar si el tratamiento previo de la muestra podía alterar al Sprifermin, se analizaron tres controles de calidad con o sin tratamiento previo de la muestra. Los resultados indicaron que la digestión con hialuronidasa no afectaba al analito, las RLU obtenidas de los QC tratados y no tratados eran comparables. (véase la tabla 10 y la figura 10)

5

	RLU no tratado	RLU tratado
QC-BAJO	1,42	1,49
	1,34	1,42
	1,38	1,36
QC-MEDIO	17,7	16,7
	17,9	16,5
	15,5	15,8
QC_ALTO	351	332
	338	337
	341	358

Tabla 10: Tabla resumen de los resultados. RLU de las muestras de QC preparadas en Rexxip HN a tres niveles de concentración (QC-Low = 30 pg/mL, QC-Medio = 500 pg/mL, QC-Alto = 15000 pg/mL) con (tratado) o sin (no tratado) digestión con hialuronidasa.

10 3.4.5. Tratamiento previo de la matriz: optimización y evaluación selectiva.

El experimento para evaluar la selectividad del método se realizó utilizando 9 muestras individuales de líquido sinovial humano. Se preparó una solución madre de hialuronidasa en PBS al 0,01% de BSA a una concentración de 400 µg/ml y se añadió (dilución 1:20) a las 9 muestras individuales de líquido sinovial. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y luego se centrifugaron dos veces a 13000 rpm durante 5 minutos. Después del tratamiento previo de la matriz, se añadió Sprifermin a cada una de las 9 muestras a una concentración de 100 pg/ml (LLOQ) y se diluyó 1:5 en Rexxip HN de acuerdo con el procedimiento de la tecnología AlphaLISA.

15

Resultados

Después de haber analizado algunas muestras individuales de líquido sinovial humano, se decidió elevar la concentración de hialuronidasa a 20 µg/ml y posponer las etapas de centrifugación después. Esto se hizo porque el líquido sinovial de diferentes individuos no se encontraba claro en todos los casos (datos no mostrados). Como se muestra en la Tabla 11, 9 de cada 10 muestras tenían una media de % SESGO dentro de ± 25%. El criterio de aceptación para la selectividad es: al menos el 80% de las muestras individuales enriquecidas en la concentración de LLOQ debe tener un % SESGO de ± 25%. Por lo tanto, se cumplen los criterios de aceptación.

20

Muestras enriquecidas individuales a 100 pg/ml	BCC PROMEDIO ng/ml	% SESGO medio de cada conc.	%CV
Muestra 1	22,6	13,0	6,3
Muestra 2	20,0	-0,1	16,5
Muestra 3	22,5	12,3	6,7
Muestra 4	31,9	59,6	21,1
Muestra 5	20,8	4,2	15,1
Muestra 6	17,9	-10,5	4,7
Muestra 7	15,5	-22,3	3,9

Muestra 8	17,8	-11,0	11,5
Muestra 9	20,9	4,5	2,9
Muestra 10	15,4	-22,8	16

Tabla 11: Tabla resumen de los resultados. BCC = Concentraciones calculadas de nuevo de muestras de líquido sinovial enriquecidas a la concentración LLOQ (100 pg/mL, concentración final 20 pg/mL) promedio de 3 repeticiones. % SESGO: exactitud de BCC. % CV = precisión de BCC. En rojo: % CV o % sesgo fuera de los criterios de aceptación ( $\pm 25\%$ )

### 3.5. Evaluación del arrastre y optimización del método Gyrolab.

Para evaluar la presencia del efecto de arrastre, se realizó un experimento particularizado utilizando el método particularizado "Bioaffy 1000 v1 mod wash" con la adición de la Solución de lavado 2 (WS2: NaCl 1,5 M en 20% de etanol). Se realizaron las siguientes preparaciones: 1) una curva estándar preparada diluyendo Sprifermin a las siguientes concentraciones: 20, 10, 5, 1 ng/mL, 200, 50, 20 pg/mL en Rexpix HN; 2) QC a 20 ng/mL en Rexpix HN; 3) muestra en blanco preparada con solo Rexpix HN.

El experimento se configuró para hacer que cada una de las 8 agujas contuviera:

1. Una muestra en blanco primera;
2. Un punto de curva estándar;
3. Una muestra de QC de 20 ng/ml;
4. Una muestra en blanco al final.

Los reactivos de captura y detección se utilizaron en las concentraciones anteriormente definidas.

### Resultados

Como el Gyrolab es un sistema robótico en el que las muestras se manejan utilizando un conjunto fijo de agujas, la posibilidad de que aparezca un efecto de arrastre debe excluirse mediante la realización de una evaluación específica. Para este propósito, se diseñó un experimento, para hacer que cada aguja contuviera una muestra en blanco, luego un estándar a alta concentración y, después, una muestra en blanco a continuación. Todos los blancos antes y después del QC de alta concentración dieron concentraciones BQL (Consúltese la Tabla 12), sin embargo, hubo un aumento en la respuesta promedio anterior y posterior, lo que indica una posible presencia de arrastre, incluso siendo el efecto bajo.

	BLK anterior (RLU)	QC alto (RLU)	BLK posterior (RLU)
Aguja 1	0,118	230	0,234
	0,100	236	0,223
	0,715	243	0,366
Aguja 2	0,079	232	0,248
	0,038	234	0,199
	0,084	257	0,205
Aguja 3	0,084	231	0,332
	0,068	244	0,279
	0,069	244	0,305
Aguja 4	0,038	236	0,231
	0,061	246	0,369
	0,060	236	0,435



Aguja 5	0,058	242	0,224
	0,062	254	0,188
	0,063	249	0,232
Aguja 6	0,081	224	0,318
	0,057	233	0,361
	0,083	233	0,467
Aguja 7	0,066	252	0,272
	0,016	241	0,240
	0,042	252	0,294
Aguja 8	0,109	254	0,468
	0,091	229	0,434
	0,089	220	0,452
promedio RLU	0,10	240	0,31
%CV	137,7	4,2	29,8

Tabla 12: Resultado de la evaluación de arrastre. RLU de blanco anterior, QC alto y blanco posterior se muestran para cada aguja. Los datos promedios se presentan para cada muestra. El STD.1 RLU en el límite de cuantificación fue de 0,655. Subrayado: valor atípico

5 3.5.1. Impacto en muestras LLOQ

Con el fin de evaluar si el ligero arrastre observado en el experimento anterior podía tener impacto en las muestras a las concentraciones de LLOQ, se realizó la misma evaluación sustituyendo las muestras en blanco con muestras enriquecidas de líquido sinovial a la concentración LLOQ (100 pg/ml, concentración final en el pocillo 20 pg/ml).

El experimento se configuró para hacer que cada una de las 8 agujas contuviera:

- 10
1. Una muestra de LLOQ primera;
  2. Un punto de curva estándar;
  3. Una muestra de CC de 20 ng/ml;
  4. Una muestra de LLOQ al final.

- 15
- El mismo método utilizado en el experimento anterior se usó para analizar una muestra LLOQ antes y después de una muestra a alta concentración y también se evaluó un método modificado con solo cambios menores en el procedimiento de lavado de la aguja. Se añadió una etapa adicional de lavado con aguja con una solución de WS2 antes y después de la etapa de adición del analito. Además, durante la etapa de adición del analito, se agregó un lavado más. Este método modificado se llamó "Bioaffy 1000 wash station 2 v2 beta1".

Resultados

- 20
- Para comprender mejor el impacto de este comportamiento en las muestras, se realizó la misma evaluación para la sustitución repetida de las muestras en blanco con muestras que contenían el analito a la concentración de LLOQ. Se observó un impacto real en las muestras a concentraciones más bajas (consúltese la Tabla 13), lo que confirma la posible presencia de un efecto de arrastre.

	LLOQ antes (BCC pg/ml)	LLOQ después (BCC pg/ml)
Aguja 1	119,2	<u>142,2</u>
	114,4	<u>132,9</u>

ES 2 736 948 T3

	106,6	<u>139,0</u>
Aguja 2	117,3	<u>134,7</u>
	115,1	<u>132,4</u>
	<u>132,6</u>	119,4
Aguja 3	119,2	<u>155,0</u>
	119,8	<u>133,6</u>
	103,3	<u>133,0</u>
Aguja 4	99,9	<u>134,4</u>
	<u>120,1</u>	<u>136,5</u>
	<u>132,4</u>	<u>146,4</u>
Aguja 5	113,8	<u>132,4</u>
	113,5	<u>122,4</u>
	115,3	<u>131,0</u>
Aguja 6	<u>123,2</u>	<u>148,8</u>
	<u>120,1</u>	<u>145,9</u>
	<u>121,8</u>	<u>152,4</u>
Aguja 7	<u>123,4</u>	<u>139,3</u>
	102,1	<u>126,6</u>
	115,6	<u>135,4</u>
Aguja 8	<u>126,1</u>	<u>158,4</u>
	97,0	<u>142,9</u>
	105,6	<u>139,2</u>
promedio BCC	115,73	<u>138,09</u>
% CV	8,1	7,0

Tabla 13: Resultado de la evaluación de arrastre. La concentración calculada en la parte posterior (pg/mL) de LLOQ anterior y LLOQ posterior se muestra para cada aguja. Los datos promedios se presentan para cada muestra. Los criterios de aceptación para la concentración están entre 75 y 125 pg/mL. Subrayado: concentración fuera de los criterios de aceptación ( $100 \pm 25\%$ )

5

	LLOQ anterior (BCC pg/ml)	LLOQ posterior (BCC pg/ml)
Aguja 1	115,1	101,4
	105,4	109,3
	86,2	110,9
Aguja 2	94,5	113,5
	<u>68,9</u>	95,0
	86,9	95,6
	99,8	<u>126,4</u>

## ES 2 736 948 T3

Aguja 3	97,7	97,0
	97,3	98,7
Aguja 4	110,5	111,8
	106,1	111,4
	114,6	116,7
Aguja 5	97,5	113,7
	105,4	94,0
	88,3	86,9
Aguja 6	104,2	109,3
	<u>137,8</u>	107,4
	113,2	114,2
Aguja 7	<u>191,7</u>	118,6
	98,2	100,7
	107,0	89,2
Aguja 8	120,9	121,1
	109,3	103,3
	116,0	<u>132,5</u>
promedio BCC	107,19	107,44
% CV	21,1	10,8

Tabla 14: Resultado de la evaluación de arrastre. La concentración calculada en la parte posterior (pg/mL) de LLOQ anterior y LLOQ posterior se muestra para cada aguja. Los datos promedios se presentan para cada muestra. Los criterios de aceptación para la concentración están entre 75 y 125 pg/mL. En rojo: concentración fuera de los criterios de aceptación ( $100 \pm 25\%$ ).

### 3.6.1. Resumen

Se usa un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado contra Sprifermin como reactivo de captura (F44), y un anticuerpo monoclonal marcado con Alexa Fluor-647 contra Sprifermin se usa como reactivo de detección (F05). Los estándares de calibración y los controles de calidad se preparan en Rexxip HN. Las muestras desconocidas se analizan después del tratamiento previo con una dilución mínima de 1:5 en Rexxip HN. El intervalo del método es de 150 pg/mL a 50000 pg/mL y se extiende aún más hasta 9,6 µg/mL con una dilución que usa Rexxip HN. Puntos de la curva de calibración: 10000, 5000, 1000, 200, 100, 50, 30, 0 pg/mL. Controles de calidad: QC-H: 7000 pg/mL, QC-M: 500 pg/mL, QC-L: 90 pg/mL.

### 3.6.2. Tratamiento previo de muestras desconocidas:

Se trata de muestras desconocidas con 20 µg/mL de solución de hialuronidasa. Se agrega hialuronidasa a la muestra desconocida (por ejemplo, 2 µl de hialuronidasa 400 µg/mL a 38 µl de la muestra desconocida), se agita e incuba durante 30 minutos a 22°C con agitación. Se centrifugan las muestras desconocidas a 13.000 rpm durante 10 minutos usando una centrifuga Minispin. Se diluyen las muestras desconocidas tratadas 1:5 con Rexxip HN antes del análisis (por ejemplo, 4 µl de muestra desconocida + 16 µl Rexxip HN).

### 3.6.3. Preparación de anticuerpos

El anticuerpo de recubrimiento debe diluirse a 0,1 mg/mL en PBS-T, si no está listo para usar. El anticuerpo de detección debe diluirse en Rexxip F a 20 nM y mantenerse protegido de la luz.

3.6.4. Procedimiento

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes del análisis.
  2. Poner el Gyrolab en modo de espera, apagar el software de control Gyrolab y el instrumento, y realizar la limpieza interna de la estación de lavado con agua MilliQ
  - 5 3. Encender el instrumento y el software de control Gyrolab, iniciar y cebar el sistema con PBS-T como se describe en la Guía del usuario
  4. Realice la desorción de la aguja como se describe en la Guía del usuario utilizando WS2 una vez a la semana.
  5. Conectar la solución WS2 a la estación de lavado 2 y cebar el sistema como se describe en la Guía del usuario
  - 10 6. Crear un nuevo experimento utilizando el método del asistente de 3 etapas: "Bioaffy 1000 PBTM-087\_PMT 5". Los estándares de calibración y los controles de calidad deben analizarse por triplicado, mientras que la muestra en una sola réplica.
  7. Agregar estándares de calibración, controles de calidad, muestras desconocidas, anticuerpos de captura y detección y tampón de lavado a la microplaca de acuerdo con la lista de carga de control de Gyrolab. Cubrir con una tapa de microplaca y proteger de la luz.
  - 15 8. Cargar las microplacas y los CD según lo requiera el procedimiento de carga asistida por el instrumento e iniciar el experimento.
- Utilizar triplicados de cada solución de ETS. No incluir STD-0 en el análisis de regresión.
- Ajustar la curva estándar con una ecuación logística (autoestimación, factor de ponderación  $1/Y^2$ ) utilizando la respuesta del instrumento de cada réplica de cada estándar de calibración
- 20 Es posible diluir algunas muestras desconocidas antes del análisis si las evidencias sugieren que estas muestras tienen concentraciones por encima del límite superior de cuantificación (50.000 pg/mL). Realizar la dilución utilizando Rexpix HN a partir de las muestras iniciales diluidas a una dilución mínima (1:5). Sin embargo, debe estar documentado.
- 25 Si la concentración real de la muestra está por debajo del límite inferior de cuantificación del método (150 pg/mL), se informará que está por debajo del límite inferior de cuantificación (BQL).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ares Trading S.A.  
 <120> INMUNOENSAYOS DE PROTEÍNAS CARGADAS ALTAMENTE POSITIVAS  
 <130> P 15/008  
 <150> EP15153117.5  
 <151> 29.01.2015  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> FGF-18 humano  
 <400> 1  
 Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp  
 20 25 30  
 Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser  
 35 40 45  
 Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys  
 50 55 60  
 His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly  
 65 70 75 80  
 Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln  
 85 90 95  
 Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg  
 100 105 110  
 Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val  
 115 120 125  
 Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala  
 130 135 140  
 Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys  
 165 170 175  
 Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr  
 180 185 190  
 Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala  
 195 200 205

ES 2 736 948 T3

<210> 2

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FGF-18 truncado recombinante (Sprifermin)

<400> 2

```

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
1          5          10          15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
          20          25          30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
          35          40          45

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
          50          55          60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
65          70          75          80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
          85          90          95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
          100          105          110

Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
          115          120          125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln
          130          135          140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
145          150          155          160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys
          165          170

```

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la cuantificación automática de una proteína con carga positiva alta en una muestra de líquido sinovial humano que comprende las etapas de:
  - a) tratamiento previo de la muestra de líquido sinovial humano, comprendiendo la etapa de tratamiento previo
  - 5 - agregar una solución de hialuronidasa a la muestra de líquido sinovial humano,
  - incubar dicha muestra a una temperatura en el intervalo de 15 a 25°C,
  - Centrifugar la muestra de líquido sinovial humano.
  - b) diluir la muestra de líquido sinovial humano tratada previamente con un tampón,
  - c) inmovilizar un anticuerpo biotinilado contra la proteína con carga positiva alta en una columna,
  - 10 d) lavar la columna para eliminar el anticuerpo no unido con un tampón de lavado estándar,
  - e) proporcionar un medio de inyección para la transferencia automática de la muestra de líquido sinovial humano tratada previamente y diluida a la columna,
  - f) lavar los medios de inyección con un tampón de alta fuerza iónica antes de transferir la muestra de líquido sinovial humano tratada previamente y diluida a la columna,
  - 15 g) transferir la muestra de líquido sinovial humano tratado previamente y diluido a la columna, poniendo así en contacto la muestra de líquido sinovial humano tratado previamente y diluido con el anticuerpo biotinilado inmovilizado en condiciones en las que el anticuerpo se une específicamente a la proteína con carga positiva alta, para producir un complejo anticuerpo-proteína,
  - h) lavar los medios de inyección con un tampón de alta fuerza iónica después de la etapa g)
  - 20 i) lavar la columna con un tampón de lavado estándar;
  - j) agregar al complejo anticuerpo-proteína en la columna un anticuerpo fluorescente marcado con un tinte específico para la proteína con carga positiva alta para producir una respuesta medible, y lavar la columna con un tampón de lavado estándar,
  - k) medir la respuesta producida,
  - 25 l) determinar una cantidad de la proteína cargada positivamente en la muestra comparando la respuesta producida con la muestra con la respuesta producida con un estándar de calibración, en donde la proteína cargada positivamente tiene un punto isoeléctrico de 9,5 o por encima de éste.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína con carga positiva alta es una proteína FGF-18.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proteína FGF-18 se selecciona del grupo que consiste
  - 30 en: a) un polipéptido que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 28-207 de la SEC ID NO: 1, b) un polipéptido que comprende o que consiste en los residuos de aminoácidos 28-196 de la SEC ID NO: 1, y c) un polipéptido que comprende o consiste en la SEC ID NO: 2.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proteína FGF-18 es Sprifermin.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de alta fuerza
  - 35 iónica tiene una concentración de sal de al menos 1M.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el tampón de alta fuerza iónica es NaCl 1,5 M en etanol al 20%.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tiempo de incubación de la etapa a) es de 1 h.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de fluido sinovial humano es parte de un
  - 40 conjunto de muestras.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la columna de la etapa c) es una columna en un conjunto de columnas.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que todas las etapas se repiten
  - 45 tantas veces como sea necesario para cuantificar automáticamente una proteína con una carga altamente positiva en un conjunto de muestras de líquido sinovial humano para analizar.

Figura 1

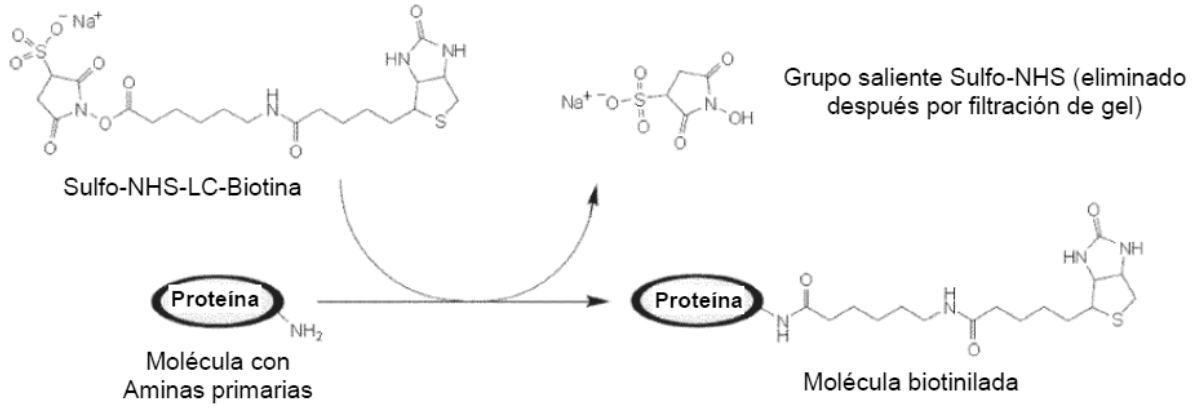


Figura 2

Determinación de equilibrio F05

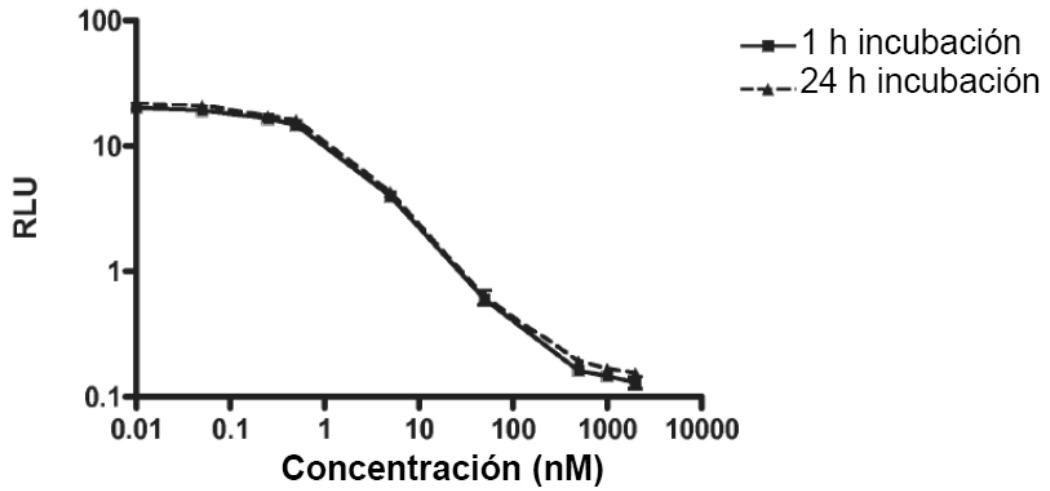




Figura 3

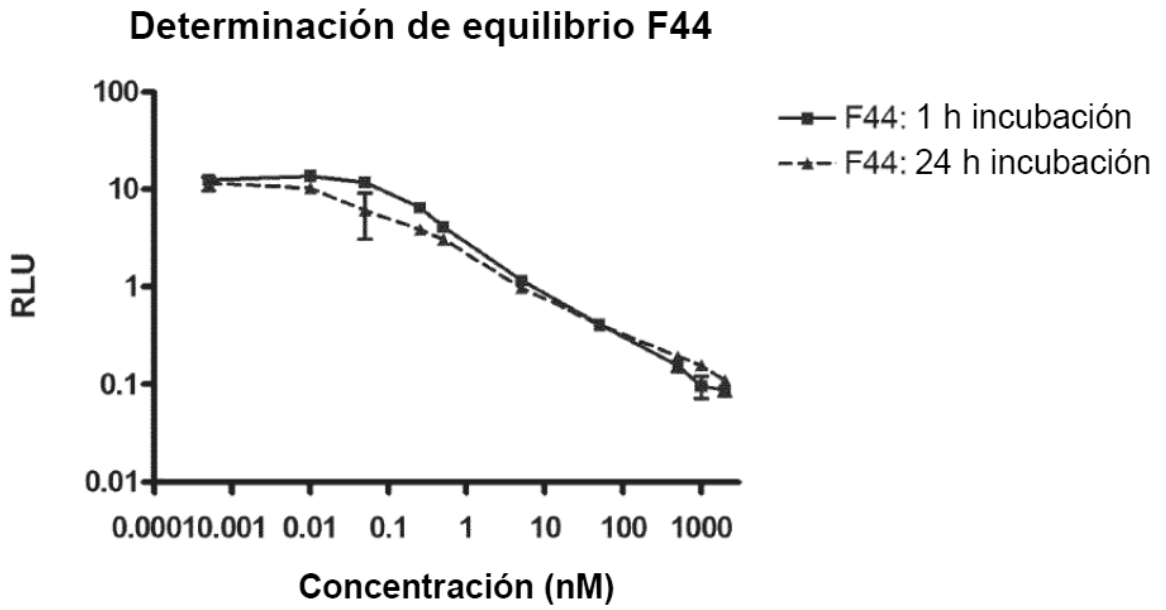


Figura 4

**Capacidad de repetición de la determinación de la afinidad de F44**

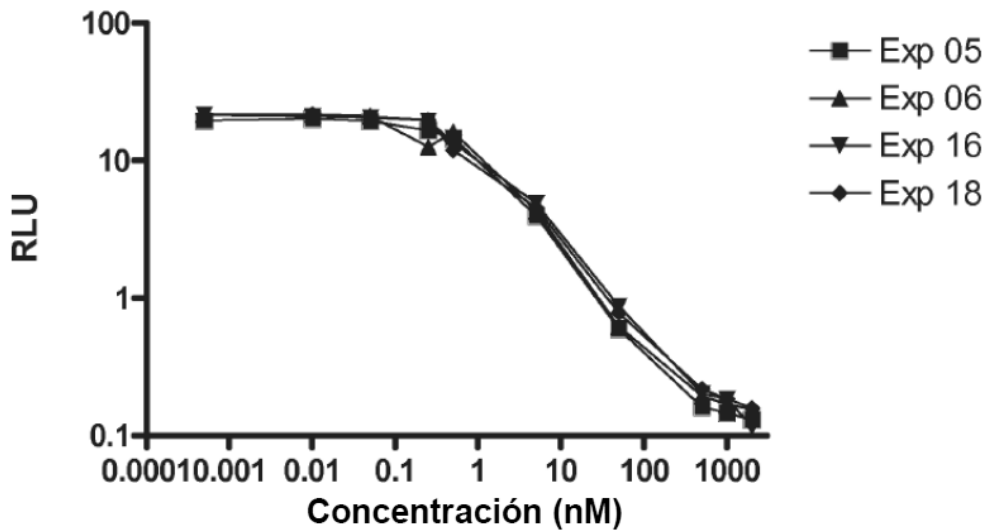


Figura 5

Capacidad de repetición de la determinación de la afinidad de F44

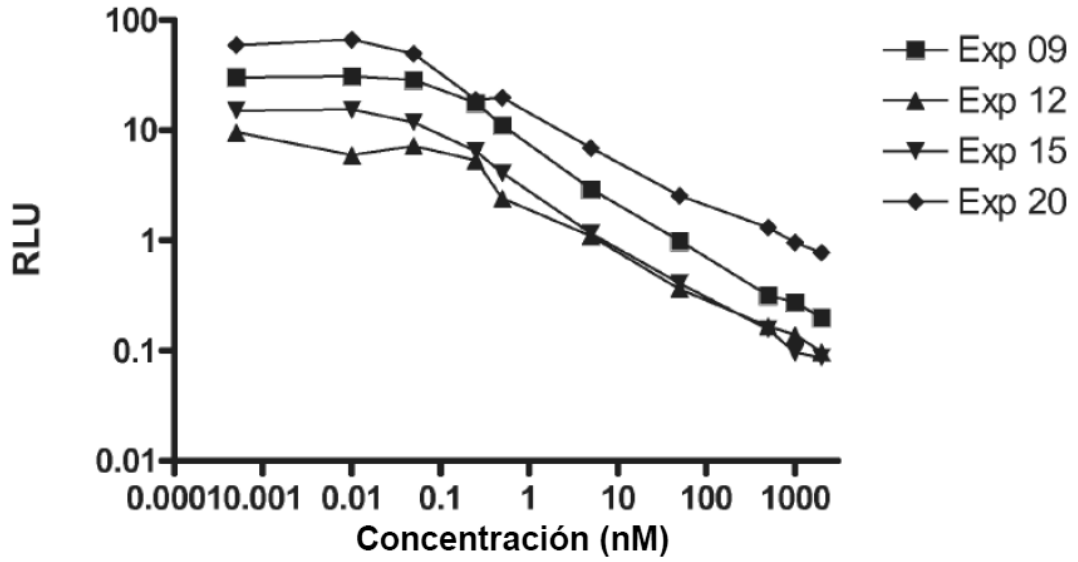


Figura 6

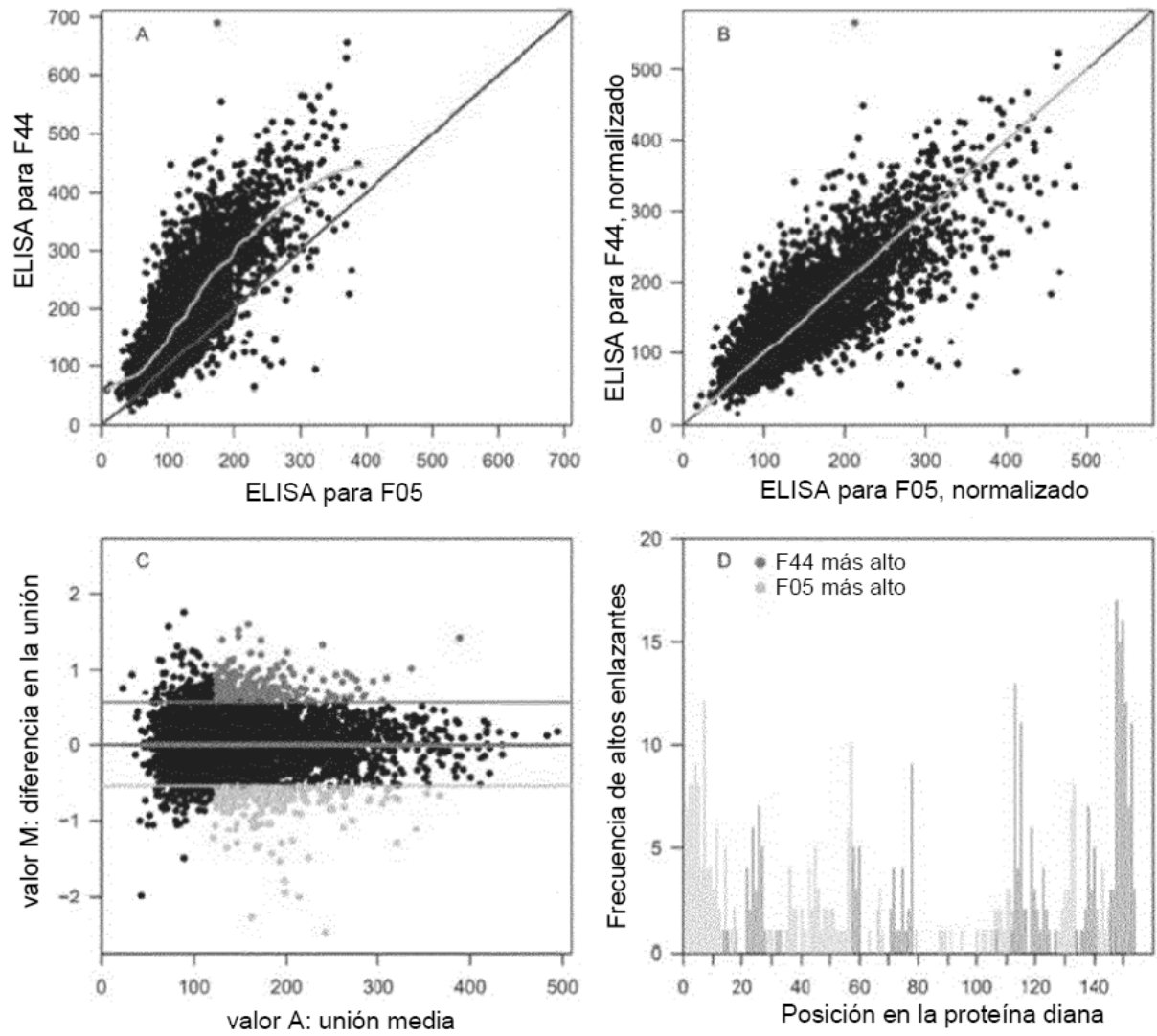


Figura 7



Figura 8

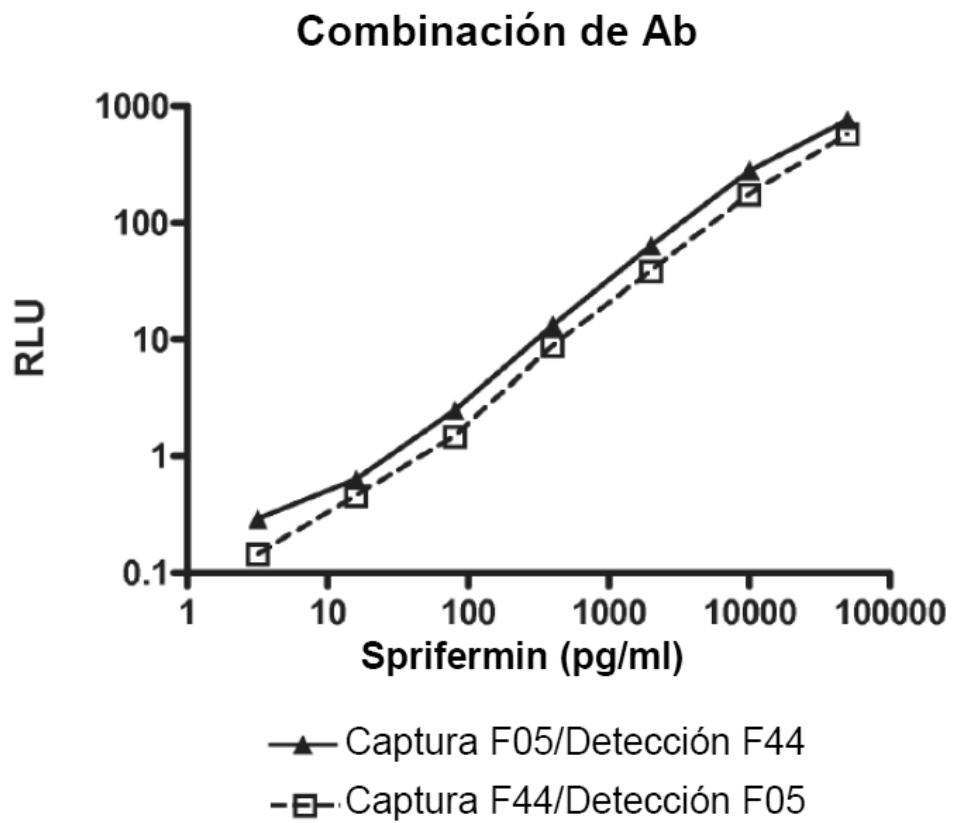


Figura 9

Dilución de fluido sinovial

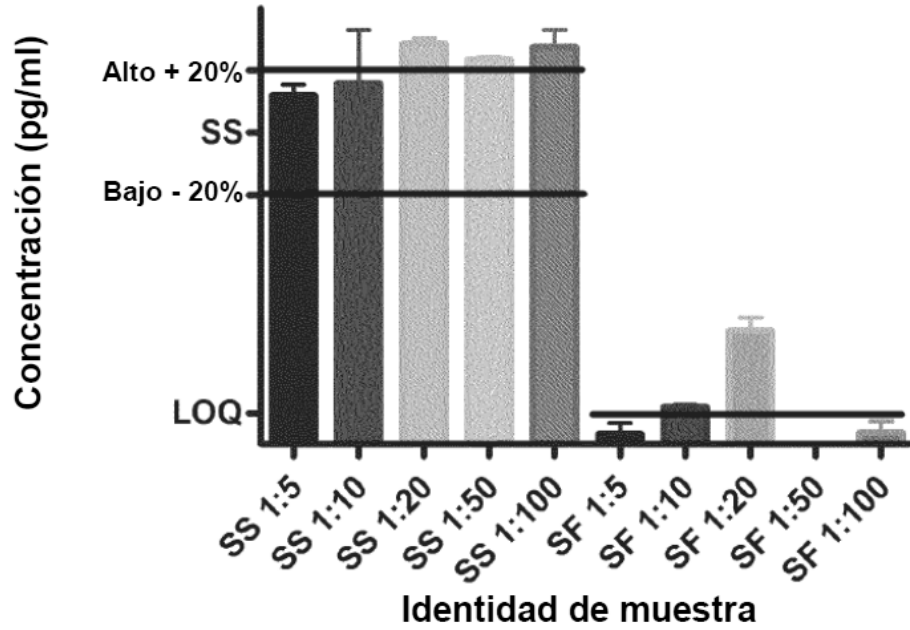


Figura 10

Tratamiento de hialuronidasa

