

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 878**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/552 (2014.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2017 PCT/FR2017/050702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17168083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2017 E 17717789 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3436827**

54 Título: **Procedimiento de determinación de las concentraciones activas y/o de las constantes cinéticas de interacción en muestras biológicas complejas en resonancia de plasmón superficial**

30 Prioridad:

29.03.2016 FR 1652699

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

20.08.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (25.0%)

35 place Pey Berland

33000 Bordeaux, FR;

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE

BORDEAUX (25.0%);

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (25.0%) y

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET

DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)

72 Inventor/es:

VISENTIN, JONATHAN;

DI PRIMO, CARMELO y

TAUPIN, JEAN-LUC

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 779 878 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de determinación de las concentraciones activas y/o de las constantes cinéticas de interacción en muestras biológicas complejas en resonancia de plasmón superficial

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de las concentraciones activas, y eventualmente de las constantes cinéticas de interacción, de un analito en muestras biológicas complejas por resonancia de plasmón superficial (SPR).

Antecedentes tecnológicos de la invención

10 Durante las tres primeras décadas del trasplante de órganos, los esfuerzos han convergido hacia la puesta a punto de tratamientos inmunosupresores activos sobre los linfocitos T, siendo el principal éxito los inhibidores de la calcineurina que han permitido reducir la incidencia de rechazos agudos celulares y un aumento de la supervivencia a corto plazo de los órganos trasplantados. Sin embargo, la supervivencia de los injertos a largo plazo solo se ha mejorado modestamente. La evolución de las técnicas que permiten detectar los anticuerpos anti-HLA ha aclarado nuestra visión de estas pérdidas de injertos tardías que parecen debidas en su mayoría a la respuesta aloinmune humoral. En efecto, cualquiera que sea el órgano, la presencia de anticuerpos específicos del donante (DSA) anti-HLA (DSA: *Donor specific antibodies*) conlleva un conjunto de lesiones inflamatorias agudas y/o crónicas que alteran la función y la supervivencia del injerto en un plazo de tiempo más o menos largo. Los DSA, del isotipo IgG, en particular, son una causa principal de pérdida del injerto en el trasplante de órganos.

20 Los DSA anti-HLA reconocen las moléculas de HLA del donante que son diferentes de las del receptor en términos de secuencias de aminoácidos. En efecto, siendo las moléculas de HLA muy polimórficas, la mayor parte de los trasplantes de órganos se realizan con diferencias entre donantes y receptores. Estas diferencias se reparten en diferentes lugares de la molécula de HLA, de manera localizada, estando una gran parte de la molécula conservada entre antígenos.

25 Los ensayos de un «único antígeno» Luminex® (SAFB) son actualmente las herramientas más precisas y sensibles para la identificación de los DSA IgG anti-HLA en el suero de los receptores. El SAFB mide una intensidad media de fluorescencia (MFI), utilizada como un valor semicuantitativo de la «fuerza» del anticuerpo. Más allá del umbral de positividad biológica que se puede definir a partir del ruido de fondo medio observado con la técnica, el umbral de positividad clínica no está todavía muy bien definido. La ausencia de material de referencia, la disparidad en términos de valores de MFI obtenidos en los diferentes laboratorios de histocompatibilidad y en función del proveedor no facilitan esta tarea. Así, la MFI no está asociada perfectamente al problema clínico, lo que podría deberse a varias razones. En primer lugar, los SAFB de clase I detectan frecuentemente los anticuerpos anti-HLA desnaturalizados de clase I, siendo estos incapaces de unirse a la superficie celular y no teniendo, por lo tanto, significancia clínica. Por consiguiente, la detección de estos anticuerpos anti-HLA desnaturalizados de clase I tiene un impacto negativo en el acceso al trasplante por sobreestimación errónea de la inmunización del paciente. En segundo lugar, las IgG anti-HLA con fuerte MFI son capaces de activar el complemento en la superficie de las bolas, dando lugar a una acumulación de los productos de degradación de C4 y de C3, capaces de reducir la detección de las IgG anti-HLA por impedimento estérico. Se ha demostrado igualmente que las IgM anti-HLA también eran capaces de interferir con la detección de las IgG a través de una competición por el epítipo, un impedimento estérico y una activación del complemento. Finalmente, siendo el SAFB una técnica de punto final, no refleja el modo de interacción de los DSA con el injerto *in vivo*, y no permite apreciar las constantes cinéticas de interacción entre los DSA y sus dianas, mientras que sus propiedades podrían influir en su patogenicidad.

45 La SPR es, en cambio, una técnica que permite determinar las constantes cinéticas de interacción. La SPR se basa en los cambios de propiedades de reflexión de una capa fina de oro sobre la que se dirige por un lado una luz polarizada a través de un prisma antes de reflejarse hacia un fotodetector, y por otro lado un ligando se inmoviliza y se baña en un flujo de tampón. En las condiciones de reflexión interna total, la luz polarizada genera una onda evanescente que penetra en la fina capa de oro y sobre algunas centenas de nanómetros en el tampón, donde una parte de los fotones se absorberá. El fotodetector mide la intensidad de la luz reflejada, lo que permite observar, a un ángulo dado, un mínimo de intensidad correspondiente a la absorción de la energía de la onda evanescente por los electrones libres de la superficie. El ángulo al que se sitúa este mínimo se denomina ángulo de resonancia y varía en función de la masa presente en el campo de la onda evanescente, en la proximidad de la capa de oro, modificando, por lo tanto, cualquier cambio de masa el índice de refracción. La SPR es, por lo tanto, una técnica que no necesita un marcaje previo de las moléculas estudiadas («sin marcaje»).

55 En la práctica, la mayoría de los instrumentos de SPR utilizan biochips que presentan una superficie de análisis separada en varios canales o spots. Una vez el ligando se une a la superficie, se inyecta una disolución que contiene el analito a estudiar a un flujo constante y durante un tiempo dado. El aparato mide permanentemente y en «tiempo real» la variación del ángulo de resonancia debida a la variación de masa en la superficie de la ranura. La señal medida en función del tiempo constituye un sensograma cuya unidad es la unidad de resonancia («resonance unit» o RU). Una RU corresponde a la fijación de un ng de proteína por mm². En ausencia de inyección de disolución a ensayar,

un tampón de paso circula sobre la superficie y la señal no varía en función del tiempo. Durante la inyección de un analito capaz de fijarse en el ligando inmovilizado, la masa aumenta en la superficie de la ranura. El ángulo de resonancia varía porque cambia el índice de refracción. La señal medida (RU) aumenta en función del tiempo. Así, es posible estudiar en tiempo real la interacción de un analito con un ligando dado. Debe observarse que la variación del ángulo de resonancia durante la formación del complejo depende de la relación de las masas entre estos dos últimos. Además, antes de poder interactuar con el ligando que está inmovilizado en la matriz del polímero, el analito debe difundir hacia el flujo (o carga) pasando por encima de esta matriz hacia esta matriz según una constante k_m que es el coeficiente de transporte de masa.

La k_m depende del coeficiente de difusión del analito (D), del flujo de inyección (f) y de las dimensiones de la celda de medida. El coeficiente de difusión del analito depende de su masa molecular, de su coeficiente de fricción, así como de la viscosidad relativa de la disolución utilizada.

Al final de la inyección, el tampón de paso toma el relevo, el analito se disocia y es arrastrado en el flujo de tampón. La masa decreciente en la superficie del canal, el ángulo de resonancia varía en el otro sentido. La señal (RU) disminuye, por lo tanto, en función del tiempo. Esta fase de disociación es más o menos rápida, según la velocidad de disociación del complejo, independientemente de la velocidad del flujo de tampón.

Para la mayor parte de las parejas antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), la velocidad de disociación del complejo es muy lenta. Esto necesita inyectar una disolución de regeneración sobre la superficie con el fin de disociar instantáneamente el complejo para poder realizar un nuevo ciclo de inyección del analito. La disolución de regeneración está constituida frecuentemente por una disolución ácida o básica, por una disolución de fuerza iónica importante o que contiene detergentes y compuestos orgánicos. Esta disolución debe disociar de manera total e instantánea los complejos analito-ligando sin degradar el ligando inmovilizado en la superficie del biochip. Esto permite multiplicar las inyecciones sobre la superficie sin tener que cambiar de canal ni volver a inmovilizar una cantidad idéntica de ligando.

En el marco del análisis de los anticuerpos frente a HLA, la inmovilización directa (covalente) de la molécula de HLA sobre el biochip no es factible porque la molécula de HLA no resiste la regeneración. Por lo tanto, tiene que ponerse a punto y validarse un sistema de captura para permitir sortear esta dificultad (Visentin *et al.*, 2016, Talanta, 148, 478-485). Así, un anticuerpo anti- β 2-microglobulina (cadena invariable asociada a todas las moléculas de HLA de clase I) se inmoviliza de manera covalente sobre la superficie y sirve para capturar las moléculas de HLA, representando el ligando, que pueden ser el sitio de la interacción con los anticuerpos anti-HLA, el analito.

La SPR permite determinar la concentración activa de un analito, es decir, la concentración de la fracción de analito capaz de interactuar con el ligando. Al contrario que otros métodos, esta medición puede realizarse sin curva de calibración. El método, conocido con el nombre de *calibration-free analysis* o CFCA, se basa en el fenómeno de limitación del transporte de masa descrito anteriormente. Si la velocidad de difusión del analito hacia la superficie es más lenta que la velocidad de asociación a su ligando, la velocidad de asociación aparente se encontrará disminuida porque dependerá de la difusión del analito hacia su diana. Para un analito utilizado en las mismas condiciones de concentración, temperatura y disolución, el coeficiente de transporte de masa (k_m) no dependerá, por lo tanto, más que de la velocidad del flujo. Se observará, por lo tanto, una pendiente de la asociación inicial diferente en función del flujo.

Así, se ha mostrado que la SPR utilizada en modo captura (Visentin *et al.*, 2016, Talanta, 148, 478-485) permitía determinar la concentración activa y las constantes cinéticas de interacción de los anticuerpos anti-HLA (Human Leucocyte Antigens) monoclonales, en un medio simple (tampón fisiológico). Hasta la fecha, este es el único método capaz de hacerlo.

La utilización de la CFCA es primordial en el contexto de los anticuerpos anti-HLA que provienen de pacientes teniendo en cuenta que, por definición, es imposible realizar una curva de calibración. Como cada individuo tiene a priori anticuerpos únicos en términos de afinidad con su HLA diana, no existe material de referencia.

La utilización de un flujo lento, de una gran cantidad de ligando inmovilizado y de una concentración de analito baja, favorecen la limitación por el transporte de masa. En el marco de esta aplicación en modo captura, es necesario inmovilizar una cantidad muy grande de anticuerpo de captura sobre la superficie. El analito se inyecta entonces según dos flujos diferentes, uno lento y uno rápido. La comparación de las velocidades de asociación en función del flujo utilizado permite calcular la concentración activa del analito.

La SPR permite igualmente determinar la afinidad del complejo analito-ligando inyectando concentraciones crecientes de analito sobre la superficie. Los experimentos pueden realizarse en varios ciclos de asociación - disociación más regeneración [análisis cinético en ciclos múltiples o *multiple cycle kinetics analysis* (MCK)], o inyectando concentraciones crecientes del analito hasta la saturación de la diana, sin ciclo de regeneración entre las inyecciones [análisis cinético con ciclo único o *single cycle kinetics analysis* (SCK)]. Estos dos métodos ya se han utilizado en modo captura.

Los programas informáticos de análisis permiten realizar un ajuste o «fit» de los sensogramas según un modelo de interacción dado, lo más frecuentemente un modelo bimolecular simple 1:1. Las constantes elementales de asociación y de disociación, k_a y k_d , respectivamente, se determinan directamente a partir de este análisis.

Es importante indicar que para la determinación de estos parámetros es necesario conocer de manera precisa la concentración activa del analito, es decir, la concentración de la fracción de la muestra realmente capaz de interactuar con el ligando. En efecto, el conocimiento de la concentración del analito inyectado es necesario para analizar los datos cinéticos. En el marco del estudio de las parejas Ag-Ac, la determinación de la concentración del anticuerpo por técnicas espectrofotométricas o colorimétricas es inexacta ya que estas técnicas solo pueden medir una concentración total. Estas no se liberan de las impurezas que resultan de la purificación y que contribuyen al valor medido. Estas tampoco permiten estimar la fracción de anticuerpo desnaturalizado durante la purificación.

Desafortunadamente, el método descrito en Visentin *et al.*, 2016 (Talanta, 148, 478-485) no es utilizable directamente sobre medios complejos como, por ejemplo, los sueros/plasmas de pacientes y sus derivados. En efecto, la aplicación de este método choca con problemas técnicos ligados a la fijación no específica («NSB » por *non-specific binding*) de diversos constituyentes más o menos bien conocidos o desconocidos de este tipo de muestras sobre la superficie del análisis. Estos problemas de fijación no específica hacen que la interpretación de los resultados sea imposible.

Así, a pesar de la necesidad existente de determinar y caracterizar de manera fina y precisa los anticuerpos anti-HLA en muestras biológicas complejas, el método SPR no es aplicable a este tipo de muestra. Esta necesidad se puede ampliar a otras parejas analito-ligando para las que se encuentran las mismas dificultades cuando se consideran muestras complejas.

Resumen de la invención

El objeto de la invención permite resolver los problemas técnicos encontrados durante la aplicación del procedimiento de determinación de la concentración activa de un analito y eventualmente las constantes cinéticas de interacción del analito con un ligando en medios complejos tales como el suero o plasma humanos. Han sido necesarios dos años de desarrollo para la obtención de un procedimiento adaptado.

El objeto de la invención es, por lo tanto, un modo particular de aplicación de la técnica SPR en modo captura que permite obtener los parámetros de concentración activa y de constantes cinéticas de interacción para muestras complejas, y responder así a las necesidades clínicas y de investigación existentes.

La presente invención se refiere a un método para determinar en muestras biológicas complejas, con resonancia de plasmón superficial, la concentración activa de un analito y, facultativamente, las constantes cinéticas de interacción del analito con un ligando, que comprende

- la provisión de un chip de resonancia de plasmón superficial sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de un ligando del analito;

- la captura por el agente de captura de un ligando testigo que no se une al analito a ensayar;

- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un flujo determinado durante un tiempo determinado;

- la regeneración de la superficie;

- la captura por el agente de captura de un ligando que se une al analito a ensayar;

- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un mismo flujo determinado durante un mismo tiempo determinado;

- la sustracción del sensograma obtenido con el ligando testigo del sensograma obtenido con el ligando que se une al analito a ensayar; y

- el cálculo de la concentración activa del analito

- facultativamente, la determinación de las constantes cinéticas de interacción del analito con el ligando,

y caracterizado por que el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar tienen una masa similar y el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar son capturados en una cantidad equivalente por el agente de captura.

Preferentemente, la muestra biológica compleja se selecciona entre suero, plasma, orinas, líquidos de lavado, ascitis, eluatos de biopsias y medios de cultivo celular. En un modo de realización preferido, la muestra biológica compleja es suero o plasma.

En un primer modo de realización, la muestra se inyecta al menos a dos flujos diferentes y se calcula la concentración activa del analito en la muestra biológica compleja. Además, la muestra puede inyectarse a diferentes concentraciones y se calculan las constantes cinéticas de interacción del analito con el ligando en la muestra biológica compleja.

Preferentemente, la pareja analito-ligando se elige entre una pareja anticuerpo-antígeno, una pareja ligando/receptor, una pareja xenobiótico/diana molecular.

- En un modo de realización particular, el analito es un anticuerpo anti-HLA, el ligando testigo es un antígeno HLA no reconocido por el anticuerpo a ensayar y el ligando que se une al analito a ensayar es un antígeno HLA diana del anticuerpo a ensayar. La muestra puede ser sometida a uno o varios tratamientos previos seleccionados entre un tratamiento térmico, un tratamiento con ditiotreitól (DTT), una etapa de purificación de las IgG sobre una resina de proteína G, una etapa de concentración de la muestra, una etapa de diálisis, en particular con un umbral de corte (cut-off) de 100 kDa, y una combinación de varios de estos tratamientos. Preferentemente, la muestra se somete previamente a una combinación de un tratamiento térmico y de una etapa de purificación de las IgG sobre una resina de proteína G. Preferentemente, el método comprende una etapa previa en la que se detectan los anticuerpos anti-HLA en la muestra.
- 5
- 10 Aquí, también se describe un kit que comprende un chip de resonancia de plasmón superficial que comprende al menos dos o tres canales elegidas entre los siguientes canales:
- un canal sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de los antígenos HLA de clase I, por ejemplo, específico de la $\beta 2$ microglobulina,
 - un canal sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de los antígenos HLA-DQ (clase II);
 - 15 - un canal sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de los antígenos HLA-DR (clase II); y
 - un canal sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de los antígenos HLA-DP (clase II).

Descripción detallada de la invención

- Como el método descrito en Visentin *et al.*, 2016 (Talanta, 148, 478-485) no es utilizable en medios complejos como, por ejemplo, sueros/plasmas de pacientes y sus derivados, los inventores se esforzaron en poner a punto este método para muestras complejas. En efecto, la aplicación de este método choca con problemas técnicos ligados a la fijación no específica («NSB» por *non-specific binding*) de diversos constituyentes más o menos bien conocidos o desconocidos de este tipo de muestras sobre la superficie de análisis. Por fijación no específica se entiende la fijación no deseada de moléculas distintas del analito sobre el ligando. Estos problemas de fijación no específica hacen que la interpretación de los resultados sea imposible.
- 20
- 25 El objeto de la invención ha sido descubrir soluciones técnicas capaces de corregir la NSB. Es entonces posible determinar la concentración activa del analito, las constantes cinéticas de interacción entre el analito y el ligando y, por deducción, la constante de afinidad para su diana de los analitos presentes en los medios complejos tales como los líquidos biológicos que derivan de sujetos humanos. La invención es igualmente utilizable con otros medios que pueden generar NSB tales como los sobrenadantes de cultivo celular que contienen los anticuerpos a estudiar. Debe indicarse que para la determinación de las constantes cinéticas de interacción es necesario conocer la concentración activa y que la concentración activa es en sí misma un parámetro que puede ser útil de manera independiente de las constantes cinéticas. El objeto de la invención es la culminación de dos años de experimentos destinados a poder analizar medios complejos tales como muestras de pacientes, por lo tanto, para eliminar la NSB que generan sistemáticamente.
- 30
- 35 Los inventores han descubierto que cada muestra debe utilizarse como su propio blanco sobre un canal sobre el que se captura una molécula HLA no reconocida por los anticuerpos presentes en la muestra en una cantidad equivalente a la molécula HLA diana de estos anticuerpos. Esto permite una corrección sistemática de la NSB y la obtención de resultados fiables. Este ensayo se designará como el auto-blanco. Esta estrategia ha sido ensayada por los inventores y se ha mostrado eficaz en sueros de pacientes.
- 40 Este método, desarrollado para el análisis de los anticuerpos anti-HLA en muestras complejas, es aplicable al análisis de otras parejas analito-ligando en muestras complejas. Principalmente, este método es aplicable al análisis de parejas analito-ligando elegidas entre una pareja anticuerpo-antígeno, una pareja ligando/receptor, una pareja xenobiótico/diana molecular.
- 45 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un método que permite determinar la concentración activa de un analito y/o las constantes cinéticas de interacción entre un analito y un ligando en una muestra compleja, comprendiendo el método:
- la provisión de un chip de resonancia de plasmón superficial sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de un ligando del analito;
 - la captura por el agente de captura de un ligando testigo que no se une al analito a ensayar;
 - 50 - el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un flujo determinado durante un tiempo determinado;
 - la regeneración de la superficie;
 - la captura por el agente de captura de un ligando que se une al analito a ensayar;

- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un mismo flujo determinado durante un mismo tiempo determinado;
 - la sustracción del sensograma obtenido con el ligando testigo del sensograma obtenido con el ligando que se une al analito a ensayar; y
 - el cálculo de la concentración activa del analito,
- 5 - facultativamente, la determinación de las constantes cinéticas de interacción del analito con el ligando, utilizando la misma superficie después de la modificación de los parámetros de captura de los ligandos y de la inyección del analito, y caracterizado por que el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar tienen una masa similar y el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar son capturados en una cantidad equivalente por el agente de captura.
- 10 Por «agente de captura específico de un ligando del analito» se designa una molécula capaz de establecer una unión específica con un ligando que es él mismo capaz de interactuar específicamente con el analito.
- Por «ligando testigo que no se une al analito a ensayar» se designa una molécula capaz de establecer una unión específica con el agente de captura, pero incapaz de establecer una unión específica con el analito a ensayar.
- 15 Por «ligando que se une al analito a ensayar» se designa una molécula capaz de establecer una unión específica con el agente de captura y con el analito a ensayar. Este ligando puede designarse igualmente en la presente solicitud como ligando diana.
- Los ejemplos prácticos que ilustran estas designaciones son los siguientes.
- En el contexto de una pareja analito-ligando que es una pareja anticuerpo-antígeno, el agente de captura es una molécula que tiene una capacidad de unión al antígeno, por ejemplo, un anticuerpo específico del antígeno, el ligando testigo es una molécula capaz de ser unida por el agente de captura, pero no por el anticuerpo, el ligando es el antígeno, y el analito es el anticuerpo específico del antígeno. Por ejemplo, el agente de captura puede ser igualmente un aptámero oligonucleotídico. Los aptámeros son, en general, compuestos sintéticos, aislados *in vitro* a partir de bibliotecas combinatorias de un gran número de compuestos de secuencias aleatorias por un método de selección iterativa denominado SELEX.
- 20
- 25 En el contexto de una pareja analito-ligando que es una pareja receptor-ligando, el agente de captura es una molécula que tiene una capacidad de unión al ligando, por ejemplo, un anticuerpo específico del ligando, el ligando testigo es una molécula capaz de ser unida por el agente de captura, pero no por el receptor, el ligando es el ligando del receptor, y el analito es el receptor específico del ligando, o a la inversa, el ligando puede ser el receptor y el analito un ligando del receptor.
- 30 En el contexto de una pareja analito-ligando que es una pareja xenobiótico-diana molecular, el agente de captura es una molécula que tiene una capacidad de unión a la diana molecular, por ejemplo, un anticuerpo específico de esta diana, el ligando testigo es una molécula capaz de ser unida por el agente de captura, pero no por el xenobiótico, el ligando es la diana molecular, y el analito es el xenobiótico.
- 35 Por específica, se entiende una fijación preferente respecto a otras, preferentemente por un factor de al menos 100, 1.000 o 10.000.
- Por «sensograma» se entiende la representación (gráfica) de la señal SPR medida en función del tiempo, correspondiente a la variación del ángulo de resonancia debida a la variación de masa en el campo de la onda evanescente. La señal de resonancia se expresa en unidades de resonancia (RU). Preferentemente, los sensogramas se miden con una máquina Biacore adaptada o equivalente, principalmente Biacore T200.
- 40 Cuando se precisa que el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar tengan masas similares, esto significa que los ligandos, cuando se fijan al agente de captura, generan una señal sustancialmente idéntica. Así, en un modo de realización particular, sus masas no difieren más del 10 %, preferentemente más del 5 %. Así, para un ligando que se une al analito a ensayar de 100 kDa, la masa del ligando testigo estará comprendida entre 90-110 kDa, preferentemente entre 95-105 kDa.
- 45 Cuando se precisa «capturados en cantidad equivalente por el agente de captura», esto significa que la cantidad de molécula capturada, preferentemente medida en RU, es la misma más o menos el 20 %, preferentemente más o menos el 15, de manera aún más preferida más o menos el 10 %. La cantidad de molécula capturada se mide preferentemente en RU.
- 50 Se debe indicar que la etapa de auto-blanco en presencia del ligando testigo puede realizarse antes o después de la etapa de ensayo del analito con el ligando diana.
- En el contexto específico donde el analito es un anticuerpo anti-HLA, la presente invención se refiere, por lo tanto, a un método que permite determinar la concentración activa y/o las constantes cinéticas de interacción de anticuerpos

anti-HLA a ensayar con el antígeno HLA reconocido por el anticuerpo en una muestra compleja, comprendiendo el método:

- la provisión de un chip de resonancia de plasmón superficial sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de los antígenos HLA reconocidos por el anticuerpo;
- 5 - la captura o inmovilización por el agente de captura de un antígeno HLA no reconocido por el anticuerpo a ensayar;
- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un flujo determinado durante un tiempo determinado;
- la regeneración de la superficie;
- la captura por el agente de captura de un antígeno HLA diana del anticuerpo a ensayar;
- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un mismo flujo determinado durante un mismo tiempo determinado;
- 10 - la sustracción del sensograma obtenido con el antígeno HLA no reconocido por el anticuerpo anti-HLA del sensograma obtenido con el antígeno HLA reconocido por el anticuerpo anti-HLA; y
- el cálculo de la concentración activa del anticuerpo que reconoce el antígeno HLA
- facultativamente, la determinación de las constantes cinéticas de interacción del analito con el ligando, utilizando la misma superficie después de la modificación de los parámetros de captura de los ligandos y de la inyección del analito,
- 15 y caracterizado por que el antígeno HLA no reconocido por el anticuerpo a ensayar y el antígeno HLA diana del anticuerpo a ensayar son capturados en una cantidad equivalente por el agente de captura.

Se debe indicar que la etapa de auto-blanco puede realizarse antes o después de la etapa de ensayo del anticuerpo anti-HLA con el antígeno HLA diana.

Por «HLA diana del anticuerpo» se entiende el antígeno HLA reconocido por el anticuerpo anti-HLA.

- 20 El método se refiere muy particularmente a los anticuerpos anti-HLA. Preferentemente, los anticuerpos son IgG, principalmente IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. Más particularmente, el método se aplica a las IgG respecto a las IgM.

Chip

- 25 El chip es un soporte sólido adaptado a la SPR. Dichos chips son muy conocidos por el experto en la técnica. La superficie activa está constituida por una matriz de polímeros (dextrano) fijada sobre una capa de oro mediante un conector (unión química). Preferentemente, el chip comprende una capa de dextrano carboximetilado unida de manera covalente a la capa fina de oro depositada sobre la superficie. La matriz permite inmovilizar de manera covalente el agente de captura gracias a una química de acoplamiento simple que utiliza, por ejemplo, los grupos aminos, tioles, hidroxilos, carboxilos o aldehídos. Es igualmente posible utilizar un sistema no covalente, es decir de captura, por ejemplo, inmovilizando un anticuerpo que reconoce el agente de captura (por ejemplo, un anticuerpo anti IgG de ratón si el agente de captura es una IgG de ratón), o bien inmovilizando estreptavidina o conjugados de níquel para unir el agente de captura que se habrá funcionalizado previamente con la biotina o una «etiqueta» de histidina, respectivamente.
- 30

Diversos chips compatibles están disponibles comercialmente (GE Healthcare, Xantec Bioanalytics). Preferentemente, el chip es un chip CM5 vendido por GE Healthcare.

- 35 Agente de captura

- El chip de SPR presenta un agente de captura inmovilizado sobre la superficie. este agente de captura es capaz de fijar un ligando específico del analito. El agente de captura puede unirse directamente al ligando, por ejemplo, puede ser un anticuerpo específico del ligando. De manera alternativa, el agente de captura puede unirse indirectamente al ligando, por ejemplo, mediante una etiqueta (*tag*) unida al ligando y a través de un anticuerpo dirigido contra esta etiqueta. Las etiquetas pueden ser, por ejemplo, etiquetas de poli-histidina, glutatión S-transferasa, o equivalente.
- 40

El agente de captura puede ser un anticuerpo o un derivado de un anticuerpo como un anticuerpo Fv, un anticuerpo de dominio único (dsFv o nanocuerpo), un anticuerpo de cadena única (scFv), un Fab, un F(ab')₂, un Fab', un sc(Fv)₂, o un aptámero oligonucleotídico. Este agente de captura se inmoviliza sobre el chip por una química de acoplamiento o una unión no covalente de tipo biotina-estreptavidina.

- 45 En el contexto particular de los anticuerpos anti-HLA, el agente de captura es específico del antígeno HLA para el que los anticuerpos a ensayar en la muestra tienen una afinidad.

Cuando el anticuerpo a ensayar es un anticuerpo dirigido contra una molécula de HLA de clase I, el agente de captura es específico de esta clase de HLA. Puede ser, por ejemplo, específico de la β 2 microglobulina (β 2M) o de un locus HLA de clase I. De los anticuerpos comerciales específicos de la molécula HLA de clase I, y preferentemente de la β 2

microglobulina humana, están disponibles, por ejemplo, el clon B2M-01 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL), el clon B2M-02 (Abcam, Francia), el clon # 883028 (R&D Systems, Francia) o el clon W6/32.

5 Cuando el anticuerpo a ensayar es un anticuerpo dirigido contra una molécula de HLA de clase II, el agente de captura es específico de esta clase o de un locus de HLA de clase II. Puede, por ejemplo, estar dirigido específicamente contra los antígenos HLA-DR, HLA-DQ y/o HLA-DP. Están disponibles anticuerpos comerciales específicos. Principalmente, existen anticuerpos que presentan especificidades cruzadas lo que permite reconocer la mayor parte de las HLA de clase II como el anticuerpo del Clon REA332 (Miltenyi Biotec) o el clon Tu39 (BD Biosciences, Francia). De manera alternativa, el método puede utilizar los anticuerpos pan-DQ como el clon Tu169 (BD Biosciences, Francia) o el clon H1456 (One Lambda, Inc, Canoga Park, CA). De la misma manera, para los antígenos HLA-DR, se utilizará un anticuerpo anti-HLA-DR. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen el clon G46-6 (BD Bioscience), el clon H1458 (One Lambda) o el clon L243 (Biolegend). Finalmente, para los antígenos HLA-DP, se utilizará un anticuerpo anti-HLA-DP. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen el clon B7/21 (Abcam), el clon HI43 (AbD Serotec), o el clon SP228 (Lifespan Bioscience).

15 Las técnicas de inmovilización de los agentes de captura sobre la superficie del chip son muy conocidas. La inmovilización es preferentemente mediante un enlace covalente. Por ejemplo, el acoplamiento puede realizarse mediante un enlace amida en presencia de una mezcla de N-hidroxisuccinimida y de N-etil-N'-dimetilaminopropil carbodiimida, siguiendo principalmente las instrucciones del proveedor (GE Healthcare). Este modo de realización en el que el agente de captura se inmoviliza de manera covalente presenta la ventaja de obtener una superficie regenerable. De manera alternativa, el agente de captura puede inmovilizarse mediante la pareja estreptavidina-biotina.

20 En un modo de realización, el agente de captura se inmoviliza sobre la superficie en una cantidad suficiente. Principalmente, cuando el agente de captura es un anticuerpo, puede inmovilizarse de manera que se obtengan como mínimo 10.000 RU, preferentemente como mínimo 15.000 RU, por ejemplo, entre 15.000 y 25.000 RU.

Muestras

25 Las muestras consideradas por la presente invención son muestras biológicas complejas. Principalmente, se consideran como muestras biológicas complejas las muestras sanguíneas como suero y plasma, orinas, líquidos de lavados como los lavados broncoalveolares, ascitis, o también los eluatos de biopsias y los medios de cultivo celular. En un modo de realización preferido, la muestra compleja es un suero, en particular, un suero humano.

30 Antes del estudio de la muestra por SPR, la muestra puede ser sometida a tratamientos previos. Principalmente, la muestra puede ser sometida a un tratamiento térmico, un tratamiento con ditiotreitól (DTT), una etapa de purificación de las IgG sobre una resina de proteína G, una etapa de concentración de la muestra, una etapa de diálisis, en particular con un umbral de corte (*cut-off*) adaptado al analito a ensayar, y una combinación de varios de estos tratamientos.

35 En un modo de realización preferido, cuando el analito es un anticuerpo, en particular un anticuerpo anti-HLA de isotipo IgG, la muestra se trata con una combinación de un tratamiento térmico y una etapa de purificación de las IgG. En un modo de realización preferido alternativo, la muestra se trata con una combinación de un tratamiento térmico, un tratamiento con ditiotreitól (DTT), y una etapa de diálisis con un umbral de corte de 100 kDa.

40 Por ejemplo, el tratamiento térmico puede comprender un tratamiento con calor que consiste en una incubación de la muestra a 40-70°C, preferentemente 50-60°C, en particular 56°C, durante 10 - 60 minutos, preferentemente 20-40 minutos, en particular 30 minutos.

El tratamiento con DTT puede consistir en la adición de DTT a la muestra con el fin de conseguir una concentración de DTT de 1-10 mM, preferentemente 5 mM, más un calentamiento a 30-40°C, preferentemente 37°C durante 10 - 60 minutos, preferentemente 20-40 minutos, en particular 30 minutos.

45 La purificación de las IgG puede realizarse principalmente sobre bolas de Sefarosa acopladas a la proteína G (ThermoFisher Scientific) o cualquier otro dispositivo equivalente según las recomendaciones del proveedor. La concentración de los purificados puede realizarse mediante dispositivos de centrifugación Amicon Ultra-4 10 kDa (ThermoFisher Scientific) o cualquier otro dispositivo equivalente, por ejemplo, dos veces con el fin de volver a un volumen cercano al volumen inicial.

50 La diálisis de las muestras puede realizarse frente al tampón de paso mediante dispositivos de diálisis Float-A-Lyzer G2 con un punto de corte de 100 kDa (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) o cualquier otro dispositivo equivalente.

Las muestras pueden diluirse o concentrarse igualmente, si es necesario. Principalmente, pueden utilizarse en el método con varias tasas de dilución diferentes.

Preferentemente, las muestras se preparan en el tampón de paso. Preferentemente, el tampón de paso es un tampón fosfato que puede comprender un detergente. En particular, el tampón fosfato puede ser 0,01 M y contener TWEEN® 20 (0,05 %). En un modo de realización particular, el tampón de paso es PBS-T (Sigma-Aldrich) al 0,05 %.

Captura por el agente de captura del ligando

- 5 Para realizar el auto-blanco, la superficie debe cargarse, mediante el agente de captura, con un ligando que no se une al analito a ensayar. Para realizar la medición del analito a ensayar, la superficie debe cargarse, mediante el agente de captura, con el ligando diana del analito. En un primer modo de realización, cuando el analito es un anticuerpo anti-HLA, el anticuerpo anti-HLA reconoce un HLA de clase I. Los HLA de clase I comprenden una cadena pesada, una $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) y un péptido. Los HLA de clase I comprenden tres grandes categorías: HLA-A, HLA-B y HLA-C.
- 10 En un segundo modo de realización, cuando el analito es un anticuerpo anti-HLA, el anticuerpo anti-HLA reconoce un HLA de clase II. Los HLA de clase II comprenden dos cadenas α y β y un péptido. Los HLA de clase II comprenden tres grandes categorías: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

15 Así, para realizar el auto-blanco, la superficie debe cargarse, mediante el agente de captura, con un antígeno HLA que no es reconocido por el anticuerpo a ensayar. Para realizar la medición del anticuerpo a ensayar, la superficie debe cargarse, mediante el agente de captura, con el antígeno HLA diana, es decir, el reconocido por el anticuerpo a ensayar.

20 Así, el método comprende preferentemente una etapa previa en la que se detectan los anticuerpos anti-HLA en la muestra. Por ejemplo, podrá aplicarse la técnica de *Single Antigen* en formato Luminex® (SAFB) o cualquier otro método equivalente, por ejemplo, un ELISA. Así, al final de esta etapa preliminar, se conoce la naturaleza de los anticuerpos anti-HLA contenidos en la muestra y se puede determinar cuáles son los antígenos HLA reconocidos por los anticuerpos anti-HLA presentes en la muestra. Por otra parte, el método puede comprender igualmente una etapa preliminar de dosificación de las IgG totales. Para esto, se puede aplicar, por ejemplo, una dosificación en inmunonefelometría en un BNII automatizado (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania). Preferentemente, la dosificación de las IgG totales puede realizarse antes y después del tratamiento de la muestra.

25 Preferentemente, el antígeno HLA utilizado para realizar el auto-blanco es de la misma clase que el antígeno reconocido por el anticuerpo. En efecto, tiene que ser reconocido por el agente de captura.

30 Así, si el anticuerpo anti-HLA a ensayar es un anticuerpo que reconoce un antígeno HLA de clase I, el antígeno capturado por el agente de captura para realizar el auto-blanco será igualmente un antígeno de clase I, que será reconocido, por ejemplo, por un agente de captura específico de la $\beta 2$ microglobulina. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-HLA a ensayar es un anticuerpo específico de HLA-A11, el antígeno utilizado para el auto-blanco puede ser HLA-A2.

35 De manera alternativa, si el anticuerpo anti-HLA a ensayar es un anticuerpo que reconoce un antígeno HLA de clase II, el antígeno capturado por el agente de captura para realizar el auto-blanco será igualmente un antígeno de clase II. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-HLA a ensayar es un anticuerpo específico de HLA-DQ2, el antígeno utilizado para el auto-blanco puede ser HLA-DQ7 o DQ5.

Determinación de la concentración activa del analito

40 El análisis por el método de CFCA es muy conocido por el experto en la técnica y se ha descrito principalmente en los artículos Karlsson *et al* (1993, J. Immunol. Methods, 166, 75-778) y Sigmundsson *et al* (2002, Biochemistry, 41, 8263-8276). El método para determinar la concentración activa por el método de CFCA se ha descrito principalmente en la solicitud WO2013/002717 (incorporada aquí por referencia). Este método se aplica en el sistema comercial Biacore® (comercializado por GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

Brevemente, en las mismas condiciones de concentraciones, de temperatura y de disolución, la señal SPR se mide en función del tiempo a dos flujos de inyección diferentes de la muestra a dosificar. El análisis de la velocidad inicial de asociación, diferente para cada flujo, permite determinar la concentración activa de la muestra inyectada.

45 Para la realización del sensograma, la muestra se pasa sobre el chip. Más particularmente, se inyecta con un flujo determinado durante un tiempo determinado. Principalmente, la velocidad de difusión del analito hacia la superficie debe ser más lenta que la velocidad de asociación del analito al ligando diana. En el contexto de un analito que es un anticuerpo anti-HLA, la velocidad de difusión del anticuerpo hacia la superficie debe ser más lenta que la velocidad de asociación al antígeno HLA diana. En este contexto, se observará una pendiente de asociación inicial diferente en función del flujo y la comparación de las velocidades de asociación en función del flujo utilizado permite calcular la concentración activa del analito. Así, la muestra se inyecta sobre el chip a dos flujos diferentes, un flujo lento y un flujo rápido, eligiéndose estos dos flujos de manera que se obtengan pendientes de asociación inicial diferentes. Las condiciones de temperatura, de concentración de la muestra y de tiempo de inyección permanecen inalteradas.

50

El chip se regenera entre dos mediciones de sensograma. Por regeneración se entiende que el chip recupera su estado inicial en el que la superficie solo porta el agente de captura. Las disoluciones de regeneración son muy conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, disoluciones ácidas, principalmente con un pH inferior a 3.

- 5 Los flujos lentos y rápidos se eligen de manera que la pendiente de asociación inicial a flujo lento sea lo suficientemente importante (superior a 0,3 RU/s a 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) y que se obtengan sensogramas suficientemente diferentes entre los dos flujos. Esta diferencia se indica por una «relación QC» superior a 0,2. La relación QC es el cociente Q que refleja el grado de limitación del transporte de masa:

$$Q = \frac{\text{pendiente de asociación inicial al flujo rápido}}{\text{pendiente de asociación inicial al flujo lento}} \times \sqrt[3]{\frac{\text{velocidad del flujo lento}}{\text{velocidad del flujo rápido}}}$$

- 10 En particular, el flujo rápido es como mínimo 5, 10, 15, 20 o 50 veces más rápido que el flujo lento. Principalmente, el flujo rápido puede ser 5, 10, 15, 20 o 50 veces más rápido que el flujo lento. Por ejemplo, el flujo lento puede ser de 2-20 $\mu\text{l}/\text{min}$, preferentemente de 2-10 $\mu\text{l}/\text{min}$, y de manera particularmente preferida de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. El flujo rápido puede ser de 10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$, preferentemente de 25-100 $\mu\text{l}/\text{min}$, y de manera particularmente preferida de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. El tiempo de inyección puede ser, por ejemplo, de 30 a 100 s, preferentemente de 40 a 60s, y de manera preferida de 50 s.

- 15 Para la determinación de la concentración activa, se busca la captura de la mayor cantidad posible de ligando.

- Preferentemente, en el contexto de un analito que es un anticuerpo anti-HLA, para la determinación de la concentración activa, el antígeno HLA se captura por el agente de captura en una gran cantidad. Por gran cantidad, se entiende que la cantidad del antígeno HLA capturado es como mínimo 100 RU, preferentemente más de 200, 300 o 400 RU. En un modo de realización preferido, la cantidad del antígeno HLA inmovilizado es de 500 a 8.000 RU. Preferentemente, la cantidad del antígeno HLA inmovilizado es de 500 a 2.000 RU.
- 20

Los auto-blancos con los ligandos testigos y los ensayos con los ligandos dianas se realizan en las mismas condiciones, exceptuando la diferencia entre los ligandos.

Los sensogramas obtenidos con los auto-blancos se sustraen de los sensogramas obtenidos con los ligandos dianas. Puede calcularse así la concentración activa del analito ensayado.

- 25 Determinación de las constantes cinéticas de interacción entre el analito y el ligando

- La SPR permite igualmente determinar la afinidad del complejo anticuerpo anti-HLA-antígeno HLA inyectando concentraciones crecientes de analito (y, por lo tanto, de muestra) sobre la superficie. Los experimentos pueden realizarse en varios ciclos de asociación - disociación más regeneración (análisis cinético de ciclos múltiples o *multiple cycle kinetics analysis* (MCK)), o inyectando concentraciones crecientes del analito hasta la saturación de la diana, sin ciclo de regeneración entre las inyecciones (análisis cinético de ciclo simple o *single cycle kinetics analysis* (SCK)).
- 30

- Preferentemente, para la determinación de las constantes cinéticas de interacción, el ligando se captura por el agente de captura en una cantidad baja, en particular, la cantidad más baja posible. En el contexto de un analito que es un anticuerpo anti-HLA, por cantidad baja se entiende que la cantidad del antígeno HLA inmovilizado es como máximo 150 RU, preferentemente menos de 100 RU. En un modo de realización preferido, la cantidad del antígeno HLA inmovilizado es de 20 a 100 RU, preferentemente de 50 a 100 RU.
- 35

- En este contexto, se utiliza la misma temperatura, el mismo flujo y el mismo tiempo de inyección para concentraciones variables del analito a ensayar, y, por lo tanto, concentraciones/diluciones diferentes de la muestra biológica. Como mínimo, la muestra se inyecta a dos concentraciones diferentes, por ejemplo, a 2, 3, 4, 5 o 6 concentraciones. En un modo de realización preferido, se utilizan 3 concentraciones diferentes. Preferentemente, cuando se aplica el método SCK, las concentraciones diferentes son crecientes. Las concentraciones diferentes pueden variar por un factor de 2 a 10, por ejemplo, por un factor de 2, 3, 4, o 5.
- 40

La velocidad de inyección o flujo puede ser, por ejemplo, de 1-100 $\mu\text{l}/\text{min}$, preferentemente de 10-50 $\mu\text{l}/\text{min}$, y de manera particularmente preferida de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$.

- El tiempo de inyección puede ser, por ejemplo, de 10 a 100 s, preferentemente de 40 a 70s, y de manera preferida de 60 s.
- 45

Los auto-blancos y los ensayos con los ligandos dianas se realizan en las mismas condiciones, exceptuando la diferencia de ligandos.

Los sensogramas obtenidos con los auto-blancos se sustraen de los sensogramas obtenidos con los ligandos dianas.

Los programas informáticos de análisis permiten realizar un ajuste o «fit» de los sensogramas según un modelo de interacción dado, lo más frecuentemente un modelo bimolecular simple 1:1. Las constantes elementales de asociación y de disociación, k_a y k_d , respectivamente, se determinan directamente a partir de este análisis.

Kit

5 Aquí, también se describe un kit adaptado para realizar el método según la presente invención.

En particular, el kit comprenderá un chip de SPR que presenta varios canales diferentes.

En un modo de realización, en el contexto de una pareja analito/ligando, el chip podrá comprender una o varios canales elegidos sobre el que o los que se inmovilizará un agente de captura específico del ligando como se detalla aquí anteriormente.

10 En un modo de realización particular, en el contexto de un analito que es un anticuerpo anti-HLA, el chip podrá comprender uno o varios canales elegidos entre los siguientes canales:

- un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA de clase I, por ejemplo, específico de la $\beta 2$ microglobulina,

- un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA-DQ (clase II);

15 - un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA-DR (clase II); y

- un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA-DP (clase II).

Preferentemente, el chip comprende al menos dos o tres canales elegidos entre los canales mencionados aquí anteriormente.

En un modo de realización preferido, el chip comprende:

20 - un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA de clase I, por ejemplo, específico de la $\beta 2$ microglobulina;

- un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA-DQ (clase II); y

- un canal sobre el que se inmovilizará un agente de captura específico de los antígenos HLA-DR (clase II);

En un modo de realización, el chip de SPR comprenderá además un canal de referencia.

25 El kit podrá comprender además uno o varios antígenos HLA útiles para realizar los auto-blancos y/o corresponde a las HLA dianas de los anticuerpos anti-HLA para realizar los ensayos.

El kit podrá comprender además uno o varios anticuerpos anti-HLA bien caracterizados que podrán servir como control.

30 El kit puede comprender además los reactivos necesarios para la realización del presente método, por ejemplo, seleccionados entre el tampón de carga, DTT, una resina de proteína G, etc... El kit puede comprender igualmente instrucciones de utilización.

35 Un kit tal como se ha definido aquí anteriormente puede utilizarse para la determinación de la concentración activa de un analito y/o de las constantes cinéticas de asociación del analito al ligando en una muestra biológica compleja, en particular para la determinación de la concentración activa y/o de las constantes cinéticas de asociación de un anticuerpo anti-HLA con el antígeno HLA reconocido por el anticuerpo comprendido en una muestra biológica compleja.

Utilización del método

La invención está destinada a necesidades clínicas y de investigación.

40 Principalmente, la concentración activa de los anticuerpos anti-HLA contenidos en medios complejos y sus constantes cinéticas de interacción con su diana son perfectamente desconocidas, mientras que estos parámetros podrían tener una importancia crucial en la determinación de su carácter patológico, principalmente en el marco de los trasplantes. Debe indicarse que para la determinación de las constantes cinéticas de interacción es necesario conocer la concentración activa, y que la concentración activa es en sí misma un parámetro que puede ser útil de manera independiente de las constantes cinéticas.

45 En la clínica, la determinación de estos parámetros podría permitir determinar los pacientes con un riesgo mayor de perder su injerto como consecuencia de la presencia de anticuerpos anti-HLA (interés diagnóstico y pronóstico), pero igualmente hacer un seguimiento de la eficacia de un tratamiento (modificación de la concentración de los anticuerpos

y/o de su afinidad). Después de la acumulación de un gran número de datos clínicos y biológicos, podrá ser posible mejorar las estrategias de emparejamiento de las parejas donantes/receptores mediante la elección de los antígenos HLA más «compatibles» entre ellos, es decir, induciendo la producción de anticuerpos anti-HLA poco concentrados o de baja afinidad.

- 5 En investigación, será posible utilizar los anticuerpos anti-HLA caracterizados de manera precisa, utilizando la presente invención, en modelos *in vitro* empleados actualmente en el campo (células endoteliales, linfocitos de sangre periférica, etc.), y estudiar el impacto de la concentración activa y de las constantes cinéticas sobre los mecanismos de patogenicidad de estos anticuerpos: activación del complemento, activación celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La invención permitirá igualmente comprender mejor los resultados proporcionados por las técnicas
10 rutinarias que son el *Single Antigen* en formato Luminex® y las pruebas cruzadas por microlinfocitotoxicidad y citometría de flujo.

El método desarrollado por los inventores presenta un interés en otros campos de aplicación y, de manera no exhaustiva:

- 15 - para la medición de la concentración de marcadores tumorales en medios complejos tales como las muestras humanas, por ejemplo, la beta-2-microglobulina (B2M), o el antígeno prostático (PSA). En este contexto, el agente de captura puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-anticuerpo, el ligando diana es un anticuerpo específico del marcador tumoral, el ligando testigo es un anticuerpo que no presenta afinidad para ese marcador.

- 20 - para la dosificación de $\beta 2$ microglobulina. En efecto, la $\beta 2$ microglobulina es una proteína de 11.800 Da que se dosifica diariamente en los laboratorios como marcador de primera intención en el mieloma múltiple y las linfopátías B malignas. Su dosificación también se utiliza en el pronóstico y la vigilancia terapéutica de las infecciones por VIH, en el seguimiento de enfermedades inflamatorias crónicas, en la exploración y el seguimiento de la función renal, en los pacientes con hemodiálisis o que se hayan beneficiado de un trasplante renal. Sus valores de referencia son del orden de 1 mg/ml (un poco más de 80 nM). En este contexto, el agente de captura podrá ser un anticuerpo anti-anticuerpo, el ligando testigo será un anticuerpo cualquiera que no tenga afinidad para la $\beta 2$ microglobulina, y el ligando diana será un anticuerpo anti- $\beta 2$ microglobulina.

- 30 - para la medición de la concentración activa de anticuerpos dirigidos frente a los antígenos vacunales y eventualmente la definición de sus parámetros cinéticos de interacción con su diana, con el fin de evaluar la eficacia de una vacuna, por ejemplo. En este contexto, el agente de captura podrá ser un anticuerpo dirigido frente al antígeno o una etiqueta unida al antígeno, el ligando testigo será una molécula diferente de los antígenos, pero de masa similar, y el ligando diana será uno o varios de los antígenos de la vacuna. De la misma manera, una aplicación posible se refiere a cualquier anticuerpo producido después de una infección, con el fin de conocer la eficacia de la respuesta de un individuo y su nivel de protección frente al patógeno considerado.

- 35 - para la medición de la concentración activa de citoquinas y eventualmente la definición de sus parámetros cinéticos de interacción con su receptor. En este contexto, el agente de captura podrá ser un anticuerpo dirigido frente al receptor o una etiqueta unida al receptor, el ligando testigo será un receptor o una molécula que no tiene afinidad para la citoquina, y el ligando diana será el receptor de la citoquina. Esto permitirá determinar la fracción de la citoquina capaz de interaccionar con su receptor, sabiendo que determinadas citoquinas pueden estar formando un complejo con receptores solubles, lo que les convierte en inactivas.

- 40 - para la medición de la concentración activa de moléculas farmacológicas y eventualmente la definición de sus parámetros cinéticos de interacción con su diana, por ejemplo, capturando su diana mediante un anticuerpo anti-diana o anti-etiqueta.

- 45 - para la medición de la concentración activa de anticuerpos anti-medicamentos y eventualmente la definición de sus parámetros cinéticos de interacción con su diana medicamentosa. Por ejemplo, inmovilización de la diana de una bioterapia (ej.: TNF α), la captura de la bioterapia (anti-TNF α), y la inyección de la muestra humana sobre la superficie. El auto-blanco podría obtenerse utilizando otra bioterapia dirigida frente a TNF α .

Descripción de las figuras

Figura 1. Etapas sucesivas que dan lugar al resultado esperado a partir del suero del paciente.

- Figura 2. Auto-blanco CFCA a partir de una muestra que proviene del suero de un paciente que tiene los anticuerpos anti-DQ2 (auto-blanco DQ5). Dilución de la muestra 1/200, concentración medida 1,4 nM, concentración en la muestra
50 270 nM, concentración en el suero después de la corrección en función de las dosificaciones de IgG 460 nM, relación QC 0,496.

Figura 3. Auto-blanco SCK a partir de una muestra que proviene del suero de un paciente que tiene los anticuerpos anti-DQ2 (auto-blanco DQ5). Concentración utilizada, deducida del auto-blanco CFCA: 2,16 nM, 10,8 nM y 54 nM. $k_a = 1,493.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, $k_d = 2,482.10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1,663.10^{-10} \text{ M}$.

Figura 4. Comparación del blanco (sensogramas claros) y de la reacción (sensogramas sombreados) de un auto-blanco SCK a partir de una muestra que proviene del suero de un paciente que tiene los anticuerpos anti-DQ2 (auto-blanco DQ5).

Figura 5. Sistema que permite medir la concentración de la B2m por SPR CFCA en medios complejos.

- 5 Figura 6. Sensogramas de CFCA para la dosificación de la B2m en diferentes condiciones: blanco clásico (PBS-T) y auto-blanco en un suero tratado con DTT y dializado diluido 1/1.000, 1/100 y 1/10. Los sensogramas están en gris, el ajuste realizado por el programa informático de análisis en negro.

Ejemplos

- 10 El objeto de la invención es la culminación de dos años de experimentos destinados a poder analizar medios complejos tales como las muestras de pacientes, por lo tanto, para eliminar la NSB que presentan sistemáticamente.

Los inventores han ensayado, en primer lugar, sueros de pacientes diluidos 1/10 sobre la superficie donde el B2M-01 (IgG2a de ratón anti-B2M) estaba inmovilizado (16.000 RU aproximadamente). Todos los sueros mostraban una fuerte interacción con la superficie (Tabla 1), hubiera o no inmovilización del anticuerpo de captura.

- 15 Tabla 1. Observación de la NSB con los sueros de pacientes (dilución 1/10 en PBS-T) sobre el canal de referencia (canal 3 vacío) y el canal con 16.000 RU de B2M-01 inmovilizado. Valores en RU. Flujo 25µl/min, duración de la inyección = 1 min.

Inyección	Canal 3 (vacío)	Canal 4 (B2M-01)	4-3
Suero 001	195	<u>1.871</u>	<u>1.650</u>
Suero 003	59	<u>2.000</u>	<u>1.900</u>
Suero 004	44	<u>1.544</u>	<u>1.513</u>
Suero 005	61	<u>1.260</u>	<u>1.195</u>
Suero 007	208	<u>1.988</u>	<u>1.779</u>
Suero 010	87	<u>1.412</u>	<u>1.300</u>

- 20 Se aplicaron diversos tratamientos a las muestras para intentar disminuir la NSB (eliminación de las proteínas pequeñas por diálisis o inactivación del complemento). Estos tratamientos se mostraron solamente parcialmente eficaces porque persistía una fijación residual no específica, con grados diversos. La NSB residual no presentaría problemas si fuera idéntica para todos los pacientes. En este caso, un suero o una mezcla de sueros desprovistos de anti-HLA podría utilizarse como blanco. Sin embargo, se observó que la NSB residual era muy variable entre las muestras.

- 25 Los inventores se propusieron entonces purificar las IgG séricas sobre resinas de proteína G. Los primeros resultados, utilizando las IgG purificadas diluidas en PBS-T, no fueron convincentes. Asimismo, observaron más NSB con los purificados sobre proteína G y que la NSB era igualmente variable sobre el canal de referencia, en función de la muestra analizada.

- 30 Se realizó un determinado número de otros ensayos: desnaturalización del suero con calor, agotamiento de la NSB por el paso de la muestra sobre canales aguas arriba del canal de ensayo con anti-B2M inmovilizado, pre-saturación del canal con un suero puro, adición de BSA al tampón de paso, desactivación de la superficie, inmovilización del anclaje sobre el canal de referencia. Todos se demostraron igualmente insuficientemente eficaces

- En este estadio de las investigaciones, los inventores habían asimilado que era imposible reducir la NSB obtenida a cero cuando se utilizaban muestras procedentes de pacientes. No obstante, una información crucial obtenida fue que la captura del HLA disminuía la NSB, ciertamente porque la masa de proteínas presente sobre el chip estaba aumentada en comparación con la ausencia de captura.

- 35 Fue así como los inventores idearon utilizar cada muestra como su propio blanco sobre un canal sobre el que se captura una molécula HLA no reconocida por los anticuerpos presentes en la muestra en una cantidad equivalente a la molécula HLA diana de estos anticuerpos.

- 40 Los inventores validaron, en primer lugar, este método con la ayuda de anticuerpos monoclonales, utilizados en derivados de suero de pacientes no inmunizados anti-HLA, para los que se determinó la concentración activa por CFCA. Esto se realizó para un anticuerpo anti-HLA de clase I monoclonal de ratón (anti-HLA-A2) (captura de las moléculas de HLA por un anticuerpo anti-B2m, clon B2M-01) y un anticuerpo anti-HLA de clase II monoclonal de ratón

(anti-DQ2) (captura de las moléculas de HLA por un anticuerpo anti-DQ comercial, clon Tu169). La parte del procedimiento que se desarrolló en el aparato de SPR fue la siguiente:

1- Inmovilización del anticuerpo de captura por química de acoplamiento sobre el chip de SPR;

2- Realización del método CFCA:

- 5 - Para el blanco, en un primer momento, se captura un antígeno HLA no reconocido por el anticuerpo a ensayar en gran cantidad sobre la superficie, entonces se inyecta la disolución que contiene el anticuerpo a ensayar a un flujo determinado durante un tiempo determinado. Finalmente, después de un tiempo de disociación corto, la superficie se regenera, lo que permite pasar a un ciclo siguiente.
- 10 - Para el ensayo en sí mismo, en un primer momento, se captura el antígeno HLA reconocido por el anticuerpo a ensayar en gran cantidad sobre la superficie, entonces se inyecta la disolución que contiene el anticuerpo a ensayar a un mismo flujo determinado durante un mismo tiempo determinado. Finalmente, después de un tiempo de disociación corto, la superficie se regenera, lo que permite pasar al ciclo siguiente.
- El programa informático de análisis del aparato realiza la corrección sustrayendo el sensograma del blanco del del ensayo, lo que se denomina la doble referencia (*double-referencing*).
- 15 Los inventores han podido ensayar el auto-blanco en cuatro condiciones diferentes para cada clase de HLA en comparación con el tampón de paso (RB para running buffer que es PBS-T). Para esto, utilizaron medios complejos derivados de sueros de pacientes cuyas características de NSB son las siguientes (dilución 1/2 en PBS-T con el 10 % de «NSB reducer», una disolución de dextrano suministrada por GE Healthcare que, sin embargo, no es indispensable) (Tabla 2):
- 20 Tabla 2. NSB de las muestras utilizadas para validar el método de auto-blanco para la CFCA. Flujo 25µl/min, duración de la inyección = 1 min

Anclaje	B2M-01		Tu169 (anti-DQ)	
	Calor + proteína G	Calor + DTT + diálisis	Calor + proteína G	Calor + DTT + diálisis
BOY	20	341	24	29
MOU	28	235	49	75
PIC	23/17	151/120	24	32
TAS	30/25	423/349	22	45

Esta tabla subraya la heterogeneidad de la NSB en función de las muestras y de los pretratamientos, pero igualmente del anclaje utilizado. Los ensayos siguientes se aplican para la utilización de muestras de NSB diferentes a las que comparó el método realizado en PBS-T (Tabla 3).

- 25 Tabla 3. CFCA de dos anticuerpos monoclonales en medios complejos utilizando el método de auto-blanco, en comparación con el método en medio simple «RB» que define la diana de concentración. La molécula de HLA de auto-blanco fue HLA-A11 para el anti-HLA-A2, y HLA-DQ7 para el anti-HLA-DQ2. La relación QC es un índice de calidad que atestigua la presencia de un transporte de masa. Los resultados son fiables al 100 % si la relación QC es superior a 0,2.

	Muestra	Clase I (A20L - A2/A11)			DQ (DQ20L - DQ2/DQ7)		
		PIC	TAS	RB (diana)	BOY	MOU	RB (diana)
Calor + proteína G	Concentración medida (nM)	1,5	1,7	1,4	0,69	0,65	0,73
	Relación QC	0,549	0,509	0,558	0,446	0,464	0,399
Calor + DTT + diálisis	Concentración medida (nM)	0,96	1,8	1,4	0,96	0,91	1,3
	Relación QC	0,952	1	0,558	0,391	0,405	0,296

Esta tabla pone de manifiesto la fiabilidad de los resultados obtenidos gracias al auto-blanco, siendo la diferencia con la diana del orden de un décimo nM.

Los inventores ensayaron entonces esta estrategia en 5 pacientes que tenían los anticuerpos anti-HLA DQ2 y DQ7 cuyos sueros habían sido tratados con calor, DTT, después dializados. Los resultados se presentan en la Tabla 4:

- 5 Tabla 4. CFCA de anticuerpos anti-HLA DQ a partir de muestras procedentes de sueros de pacientes. Estos sueros se habían identificado como que contenían los anticuerpos anti-HLA DQ2 o DQ7 por la técnica *Single Antigen Luminex*[®] (SAFB) cuyo valor de fluorescencia (MFI) se precisa en la tabla. El tratamiento aplicado a los sueros fue un tratamiento con calor (56°C 30 min), DTT (5mM 37°C 30 min) después diálisis frente a PBS-T (membrana 100 kDa, 1 hora, 6 horas después por la noche). La dosificación de las IgG totales realizada antes y después del tratamiento del suero permite determinar la concentración inicial de las IgG anti-HLA presentes en el suero. Para el paso sobre el aparato de SPR, las muestras se utilizaron diluidas ½ en PBS-T con 10 % de «NSB reducer». Para los anti-DQ2 (DQB1*02:01/DQA1*05:01), el auto-blanco se realizó sobre HLA-DQ7 capturado, e, inversamente, para los anti-DQ7.

	Diana	SAFB MFI	Concentración (nM)	Concentración corregida (nM)	IgG inicial (g/L)	IgG final (g/L)
BEL 1/2	DQ2	11.237	1,6	2,18	9,65	7,07
BRI 1/2	DQ2	20.507	7,6	12,71	11,00	6,58
LAP 1/2	DQ2	15.000	3,3	4,90	9,02	6,08
PLA 1/2	DQ7	20.627	3,4	5,46	8,33	5,19
THI 1/2	DQ7	21.464	2,1	2,83	11,60	8,61

- 15 Es interesante indicar que los inventores no observaron una relación perfecta entre la concentración activa de los anti-HLA-DQ obtenidos por SPR y la MFI en SAFB. Esto sugiere que los datos obtenidos por SPR podrían aportar informaciones diferentes. Esto podría ser crucial para los pacientes.

- 20 Debe indicarse que existen fuertes «saltos de tampones» durante la utilización de suero tratado calor+DTT+diálisis, y que el tiempo necesario para la obtención de una muestra lista para utilizarse en la plataforma Biacore es de 24 horas (después de la identificación de los anticuerpos en SAFB que dura medio día). Los inventores han optado más recientemente por el segundo pre-tratamiento mencionado, es decir, un tratamiento con calor de 1 ml de suero (56°C durante 30 min), después una purificación sobre resina de proteína G (1 hora), y finalmente una concentración del purificado para volver a un volumen equivalente (1 a 1,2 ml) en PBS-T. La dosificación de las IgG totales antes y después de la purificación permite volver a la concentración inicial de los anticuerpos anti-HLA.

- 25 Es importante indicar que estos dos tratamientos permiten evitar que los anti-HLA de isotipo IgM puedan estar presentes en el suero de los pacientes al mismo tiempo que las IgG. Estas IgM se han identificado como moléculas interferentes potenciales en SAFB, pero podrían igualmente entorpecer el análisis de los anti-HLA de isotipo IgG por SPR.

La figura 1 detalla las etapas sucesivas que dan lugar al resultado esperado a partir del suero del paciente. El flujo de trabajo presentado en la Figura 1 muestra que el tiempo de realización del examen es completamente compatible con una aplicación en la clínica, no siendo la caracterización de los anticuerpos anti-HLA un examen urgente.

- 30 Al final, es, por lo tanto, totalmente posible obtener un resultado en dos días de trabajo. A continuación, se presenta el ejemplo de un paciente que tiene los anticuerpos anti-DQ2 que se ha estudiado por este procedimiento. Las Figuras 2 y 3 presentan los resultados de la CFCA y de la SCK auto blanco. El ajuste de los sensogramas al modelo cinético de interacción es muy satisfactorio como lo muestra la superposición de las curvas experimentales con las curvas teóricas.

- 35 La figura 4 pone de manifiesto el nivel de NSB durante la inyección de muestra en concentración creciente y la importancia de la utilización del autoblanco que permite corregir esta NSB. En efecto, aparece claramente una fuerte fijación sobre el canal en ausencia de la molécula de HLA diana.

El método es perfectamente reproducible (Tablas 5 y 6).

ES 2 779 878 T3

Tabla 5. Auto-blanco CFCA a partir de una muestra procedente del suero de un paciente que tiene los anticuerpos anti-DQ2 (auto-blanco DQ5). Dilución de la muestra 1/200 o 1/100 a partir de partes alícuotas congeladas ensayadas en días diferentes.

	Dilución	Concentración medida (nM)	Concentración de la muestra (nM)	Relación QC
Parte alícuota 1	200	1,4	270	0,496
Parte alícuota 2	200	1,5	290	0,526
Parte alícuota 3	100	3,2	320	0,439

Tabla 6. Auto-blanco SCK a partir de una muestra procedente del suero de un paciente que tiene los anticuerpos anti-DQ2 (auto-blanco DQ5). Ensayos realizados a partir de partes alícuotas congeladas en días diferentes.

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Parte alícuota 1	$1,49 \cdot 10^6$	$2,48 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-10}$
Parte alícuota 2	$1,36 \cdot 10^6$	$2,37 \cdot 10^{-4}$	$1,74 \cdot 10^{-10}$
Parte alícuota 3	$1,24 \cdot 10^6$	$2,38 \cdot 10^{-4}$	$1,90 \cdot 10^{-10}$

5 Los inventores repitieron la utilización de esta estrategia en 10 pacientes adicionales que tenían los anticuerpos anti-HLA DQ2, DQ4, DQ6, DQ7, DQ9 y que se habían beneficiado de diferentes tipos de trasplante (pulmones, corazón, riñón, hígado). Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. CFCA y SCK de anticuerpos anti-HLA DQ a partir de muestras procedentes de sueros de pacientes. Se había identificado que estos sueros contenían los anticuerpos anti-HLA DQ por la técnica Single Antigen Luminex® (SAFB) cuyo valor de fluorescencia (MFI) se precisa en la tabla (cadena alfa asociada con la cadena beta precisada entre paréntesis cuando sea pertinente).

HLA-DQ Diana	HLA-DQ Blanco	SAFB MFI	Concentración (nM)	Concentración corregida (nM)	IgG inicial (g/L)	IgG final (g/L)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
DQ2(05)	DQ5	15.570	5,2	7,85	10,4	6,90	$5,71 \cdot 10^6$	$5,59 \cdot 10^{-4}$	$9,79 \cdot 10^{-11}$
DQ2(05)	DQ5	13.802	15	24,15	11,3	7,02	$2,43 \cdot 10^6$	$1,37 \cdot 10^{-4}$	$5,61 \cdot 10^{-11}$
DQ7	DQ5	20.442	65	100,6	6,47	4,18	$1,19 \cdot 10^6$	$1,76 \cdot 10^{-4}$	$1,50 \cdot 10^{-10}$
DQ7	DQ5	18.172	14	22,3	13,2	8,3	$2,13 \cdot 10^6$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$8,59 \cdot 10^{-10}$
DQ7	DQ5	20.763	11	17,8	11,7	7,23	$5,38 \cdot 10^5$	$6,83 \cdot 10^{-4}$	$1,27 \cdot 10^{-9}$
DQ2(05)	DQ5	23.076	280	459,2	13,4	8,17	$8,15 \cdot 10^5$	$2,35 \cdot 10^{-4}$	$2,88 \cdot 10^{-10}$
DQ2(02)	DQ6	18.807	9,7	15,8	12,1	7,41	$3,15 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$4,58 \cdot 10^{-10}$
DQ4	DQ5	18.401	27,0	40,0	7,49	5,06	$1,72 \cdot 10^6$	$4,29 \cdot 10^{-4}$	$2,49 \cdot 10^{-10}$
DQ6	DQ5	21.658	8,6	39,8	10,5	2,27	$1,97 \cdot 10^6$	$5,81 \cdot 10^{-4}$	$2,95 \cdot 10^{-10}$
DQ9	DQ6	20.000	14,0	21,3	4,29	2,82	$1,52 \cdot 10^6$	$5,93 \cdot 10^{-4}$	$3,89 \cdot 10^{-10}$

10 Los inventores han aplicado igualmente esta estrategia a un sistema distinto de los anticuerpos anti-HLA, a saber, la dosificación de la beta-2 microglobulina (B2m) en medios complejos. La medición de las constantes cinéticas de interacción de la B2m para su anticuerpo correspondiente no se ha realizado porque no posee ninguna significancia clínica o biológica.

La parte del procedimiento que se desarrolla en el aparato SPR ha sido la siguiente (Figura 5):

15 1- Inmovilización del anticuerpo de captura por química de acoplamiento sobre el chip de SPR (anti-IgG2a de ratón, clon R11-89, BD Biosciences);

2- Realización del método CFCA:

20 Para el blanco, en un primer momento, se capturó un anticuerpo que no reconoce la B2m (clon OKT3, anticuerpo anti-CD3, BD Biosciences) en una gran cantidad sobre la superficie, después se inyectó la disolución a ensayar que contenía la B2m a un flujo determinado durante un tiempo determinado. Finalmente, después de un tiempo de disociación corto, la superficie se regeneró, lo que permitió pasar a un ciclo siguiente.

Para el ensayo en sí mismo, en un primer momento, se capturó un anticuerpo que reconoce la B2m (clon B2M-01) en una gran cantidad sobre la superficie, después se inyectó la disolución que contenía la B2m a un mismo flujo determinado durante un mismo tiempo determinado. Finalmente, después de un tiempo de disociación corto, la superficie se regeneró, lo que permitió pasar al ciclo siguiente.

- 5 El programa informático de análisis del aparato realizó la corrección sustrayendo el sensograma del blanco del del ensayo, lo que se denomina doble referencia (*double-referencing*).

La concentración de una disolución de B2m recombinante (Thermo Fisher) diluida 1/10.000 en tampón de paso (PBS-T) se midió en primer lugar por CFCA captura, utilizando como blanco el tampón de paso. La concentración medida fue de 4,3 nM.

- 10 La CFCA captura se realizó a continuación en auto-blanco en un medio complejo (suero de sujeto sano tratado con calor, con DTT, después dializado frente a PBS-T sobre una membrana de 100 kDa) utilizado a 3 diluciones diferentes y proporcionando así diferentes niveles de NSB. Los valores de NSB recogidos del anticuerpo OKT3 han sido los siguientes (tabla 8).

- 15 Tabla 8. Cantidad de NSB generada por los medios complejos utilizados para la validación del auto-blanco en medios complejos para la dosificación de la B2m.

Medio complejo	NSB a un flujo de 5 µl/min (RU)	NSB a un flujo de 100 µl/min (RU)
Suero 1/10	342	575
Suero 1/100	71	152
Suero 1/1.000	14	26

Las concentraciones de B2m medidas en estas muestras han sido las siguientes (tabla 9).

Tabla 9. Dosificación de la B2m por auto-blanco de CFCA captura en diferentes medios complejos.

Medio	Concentración medida (nM)
PBS-T	4,3
Suero 1/1.000	4,0
Suero 1/100	4,0
Suero 1/10	4,7

Los sensogramas de los CFCA se representan en la Figura 6.

Materiales y métodos

- 20 • Anticuerpos y moléculas de HLA

Los anticuerpos anti-HLA de clase I monoclonales, de origen murino, utilizados fueron: los anticuerpos pan-clase I W6/32 y anti-beta2-microglobulina (clon B2M-01) (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL) y un anticuerpo anti-HLA-A2 (One Lambda, Inc, Canoga Park, CA). Los anticuerpos anti-HLA de clase II monoclonales, de origen murino, utilizados fueron: el anticuerpo pan-DQ (clon Tu169) (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) y un anticuerpo anti-HLA-DQ2 (One Lambda, Inc, Canoga Park, CA). Las moléculas de HLA purificadas HLA-A*02:01 (A2), A*11:01 (A11), DQB1*02:01/DQA1*05:01 [DQ2(05)], DQB1*02:01/DQA1*02:01 [DQ2(02)], DQB1*03:01/DQA1*05:05 (DQ7), DQB1*03:03/DQA1*02:01 (DQ9), DQB1*04:01/DQA1*03:03 (DQ4), DQB1*05:01/DQA1*01:01 (DQ5) y DQB1*06:03/DQA1*01:03 (DQ6) fueron producidas por One Lambda. Se utilizaron un anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3, BD Biosciences) y anti-IgG2a de ratón (clon R11-89, BD Biosciences).

- 30 • Experimentos en resonancia de plasmón superficial (SPR)

Los experimentos de SPR se realizaron a 25°C en un Biacore™ T200 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) con biochips CM5 (Biacore™). Los sensogramas se analizaron con el programa informático de evaluación Software de Evaluación Biacore T200. Los anticuerpos de captura se inmovilizaron mediante una química de acoplamiento por las aminas, utilizando una mezcla de N-hidroxisuccinimida y N-etil-N'-dimetilaminopropil carbodiimida según las recomendaciones del proveedor (GE Healthcare), después de haberlas diluido en una disolución de acetato de sodio (10 mM, pH 5), seguido de una desactivación de la superficie por la inyección de una disolución de etanolamina (1 M, pH 8,5, GE Healthcare). Un canal sin inmovilización se utilizó para realizar una doble corrección de los sensogramas.

- 35

Los picos aún presentes después de esta etapa no se retiraron porque no afectaban los resultados. Salvo mención contraria, las muestras se prepararon en PBS-T al 0,05 % que constituye el tampón de paso. La regeneración de la superficie se realizó por la inyección de una disolución de glicina (10 mM, pH 2,1, GE Healthcare) durante 1 minuto a 25 µl/min. Para los ensayos de evaluación de la unión no específica (NSB para *non-specific binding*), las muestras se

5

• Medición de la concentración activa

Los experimentos de «*calibration-free concentration analysis*» (CFCA) se realizaron después de una captura preliminar de los ligandos HLA (900 s a 2 µl/min para la clase I, 840 s a 2 µl/min para la clase II) que se utilizaron en tampón de paso a una dilución que permitía un nivel alto de captura, en una cantidad equivalente para una misma clase. Los anticuerpos anti-HLA se inyectaron durante 50 s a 5 µl/min después a 100 µl/min. Todas las muestras y blancos se inyectaron en duplicado. El coeficiente de difusión de los anticuerpos anti-HLA se calculó con la siguiente fórmula:

10

$$D = 342.3 \times 1 / (\sqrt[3]{PM} \times f \times hrel) \times 10^{-11}$$

donde PM es el peso molecular (150.000 Da), f es el coeficiente de fricción (1,2 para las proteínas globulares), y hrel es la viscosidad relativa (0,89 a 25°C). Los criterios de validación de la CFCA fueron los recomendados por Biacore™, es decir, una pendiente de asociación inicial al flujo lento suficientemente importante (superior a 0,3 RU/s a 5 µl/min) y sensogramas suficientemente diferentes entre los dos flujos, como se indica por un ajuste de la «relación QC» superior a 0,2. La relación QC es el cociente Q que refleja el grado de limitación del transporte de masa :

15

$$Q = \frac{\text{pendiente de asociación inicial al flujo rápido}}{\text{pendiente de asociación inicial al flujo lento}} \times \sqrt[3]{\frac{\text{velocidad del flujo lento}}{\text{velocidad del flujo rápido}}}$$

• Medición de los parámetros cinéticos

20

Los parámetros cinéticos se determinaron sobre los mismos canales que para los CFCA, pero capturando una cantidad baja de HLA (menos de 100 RU) con el fin de evitar los artefactos cinéticos observados a veces con las altas densidades de ligando. Los experimentos se realizaron a 25 µl/min utilizando el método «*single cycle kinetics*» (SCK): se inyectaron tres concentraciones crecientes del anticuerpo sucesivamente sin regeneración entre las inyecciones. Todas las muestras y blancos se inyectaron en duplicado. Las constantes de asociación y de disociación, k_a y k_d , respectivamente, se determinaron por un ajuste directo de los sensogramas según un modelo de interacción de Langmuir 1:1. Se calculó la constante de equilibrio de disociación, K_D , como igual a k_d/k_a .

25

• Sueros humanos

Los sueros humanos utilizados provenían de sujetos sanos, de pacientes inscritos en la lista de espera de trasplante de órganos o de pacientes injertados. Un mililitro de estos se utilizó en diferentes estados, es decir, con o sin pretratamiento, pudiendo combinarse varios pretratamientos. El tratamiento con calor consistió en la incubación del suero a 56°C durante 30 min. El tratamiento con ditiotreitól (DTT) consistió en la adición de DTT al suero con el fin de conseguir una concentración de DTT de 5 mM, después un calentamiento a 37°C durante 30 min. La purificación de las IgG séricas se realizó en bolas de Sefarosa acopladas a la proteína G (ThermoFisher Scientific) según las recomendaciones del proveedor. La concentración de los purificados se realizó mediante dispositivos de centrifugación Amicon Ultra-4 10 kDa (ThermoFisher Scientific) dos veces con el fin de volver a un volumen de 1.150 µl en el tampón de paso. La diálisis de las muestras se realizó frente al tampón de paso mediante dispositivos de diálisis Float-A-Lyzer G2 con un punto de corte de 100 kDa (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA). Todas las muestras se filtraron en filtros de 0,45 µm antes de su utilización. La dosificación de las IgG totales se efectuó en los sueros tratados y no tratados en inmunonefelometría en un BNII automatizado (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania).

30

35

• Ensayos SAFB

Los sueros se ensayaron con los kits Single Antigen Luminex® después de tratamiento con EDTA (10 mM final) siguiendo las recomendaciones del proveedor (One Lambda) y se analizaron en un Luminex 100® (Luminex, Austin, TX). Las intensidades de fluorescencia (MFI para *mean fluorescence intensity*) se normalizaron con la fórmula «línea base» (Programa informático Fusion®, One Lambda, Inc.).

40

45 Materiales y métodos para la Tabla 2

Se inmovilizaron 15.000 RU de anticuerpo para el canal B2M-01 (clase I), y 18.000 RU para el canal Tu169 (DQ). Los sueros humanos utilizados provenían de pacientes no inmunizados anti-HLA inscritos en la lista de espera de trasplante. Estos habían sido sometidos a un tratamiento con calor, después una purificación de las IgG en proteína G y concentración con el fin de obtener 1 ml de purificado, o bien un tratamiento con calor seguido de un tratamiento con DTT y una diálisis frente al tampón de paso. Las muestras tratadas se diluyeron ½ en el tampón de paso con el 10 % final de reductor de NSB (GE Healthcare).

50

Materiales y métodos para la Tabla 3

Se inmovilizaron 15.000 RU de anticuerpo para el canal B2M-01 (clase I), y 18.000 RU para el canal Tu169 (DQ). Los sueros humanos utilizados provenían de pacientes no inmunizados anti-HLA inscritos en la lista de espera de trasplante. Estos habían sido sometidos a un tratamiento con calor, después una purificación de las IgG en proteína G y concentración dos veces con el fin de obtener 1,15 ml de purificado en el tampón de paso, o bien un tratamiento con calor seguido de un tratamiento con DTT y una diálisis frente al tampón de paso. Los anticuerpos monoclonales A2OL (para anti-HLA-A2 One Lambda) y DQ2OL (para anti-DQ2 One Lambda) se diluyeron 1/2.000 y 1/4.000 en los sueros tratados diluidos 1/2 en tampón de paso con el 10 % final del reductor de ruido de fondo, *NSB reducer* (GE Healthcare). Para A2OL, el blanco se realizó por la inyección de este anticuerpo sobre la superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-A11 (1.103+/-16 RU), y el ensayo en sí mismo sobre una superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-A2 (1.014+/-18 RU). Para DQ2OL, el blanco se realizó por la inyección de este anticuerpo sobre la superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ7 (545+/-26 RU), y el ensayo en sí mismo sobre una superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ2 (523+/-16 RU).

Materiales y métodos para la Tabla 4

Se trataron cinco sueros de pacientes inmunizados anti-HLA DQ2 o DQ7 con calor seguido de un tratamiento con DTT y una diálisis frente al tampón de paso. La dosificación de las IgG se realizó en el suero antes y después del tratamiento. El ensayo Single Antigen se realizó en el suero tratado con EDTA (SAFB MFI). La CFCA se realizó en estas muestras diluidas 1/2 en el tampón de paso con 10 % final de reductor de NSB. Para los pacientes con los anticuerpos dirigidos a HLA-DQ2, el blanco se realizó por la inyección de la muestra sobre la superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ7, y el ensayo en sí mismo sobre una superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ2, y viceversa para los pacientes con los anticuerpos dirigidos a HLA-DQ7. Los niveles de captura fueron de 807+/-19 para HLA-DQ2 y 801+/-23 para HLA-DQ7, sobre un canal donde se habían inmovilizado 20.000 RU de Tu169. La concentración corregida corresponde a la concentración presente inicialmente en el suero, obtenida por deducción de las dosificaciones de IgG totales en los sueros (IgG inicial) y las muestras tratadas (IgG final).

Materiales y métodos para la Figura 2

Se trató un suero de paciente inmunizado anti-HLA DQ2 con calor, después se sometió a una purificación de las IgG en proteína G y concentración dos veces con el fin de obtener 1,15 ml de purificado en el tampón de paso. La CFCA se realizó en esta muestra diluida 1/200 en el tampón de paso con 10 % final de reductor de NSB. El blanco se realizó por la inyección de la muestra sobre la superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ5 (818 +/- 2 RU). El ensayo en sí mismo se realizó sobre una superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ2 (790+/-3 RU) por 15.000 RU de Tu169 inmovilizado.

Materiales y métodos para las Figuras 3 y 4

La SCK se realizó sobre la misma muestra que en la Figura 2 a concentraciones deducidas de la CFCA, inyectadas según este orden: 2,16 nM, 10,8 nM y 54 nM durante 60 s a 25 µl/min, sin regeneración entre las inyecciones. Después de la tercera inyección, se aplicó un periodo de disociación de 400 s. El blanco se realizó por la inyección de la muestra sobre la superficie donde se había capturado una cantidad baja de HLA-DQ5 (78+/-0 RU). El ensayo en sí mismo se realizó sobre una superficie donde se había capturado una cantidad baja de HLA-DQ2 (82,5+/-0,7 RU) por 15.000 RU de Tu169 inmovilizado.

Materiales y métodos para la Tabla 7

El tratamiento aplicado a los sueros fue una exposición al calor, después una purificación de las IgG en proteína G y concentración dos veces con el fin de obtener 1,15 ml de purificado en el tampón de paso. La CFCA se realizó en estas muestras diluidas 1/2 al 1/200 en el tampón de paso con 10 % final de reductor de NSB. El blanco se realizó por la inyección de la muestra sobre la superficie donde se había capturado una gran cantidad de HLA-DQ no reconocido por el suero del paciente por 10.300 RU de Tu169 inmovilizado. El ensayo en sí mismo se realizó sobre la misma superficie donde se había capturado una cantidad de HLA-DQ diana en una cantidad equivalente al antígeno utilizado para el blanco. Los SCK se realizaron sobre las mismas muestras y canales de análisis a concentraciones crecientes deducidas de la CFCA durante 60 s a 25 µl/min, sin regeneración entre las inyecciones. Después de la tercera inyección, se aplicó un periodo de disociación de 400 s. El blanco se realizó por la inyección de la muestra sobre la superficie donde se había capturado una cantidad baja de HLA-DQ no reconocido por el suero del paciente. El ensayo en sí mismo se realizó sobre la misma superficie donde se había capturado una cantidad de HLA-DQ diana en una cantidad equivalente al antígeno utilizado para el blanco.

Materiales y métodos para la Figura 6

Un clon de anticuerpo anti-IgG2a de ratón (R11-89, BD Biosciences) se inmovilizó a un nivel de 13.000 RU por química de acoplamiento sobre un chip CM5. Se midió en primer lugar la concentración de una disolución de beta-2 microglobulina (B2m) diluida 1/10.000 en el tampón de paso (PBS-T) por CFCA captura, capturando 2.400 RU de un anticuerpo que reconoce la B2m (clon B2M-01) y utilizando como blanco el tampón de paso («PBS-T»). La medición

ES 2 779 878 T3

de la concentración de la B2m se repitió entonces utilizando el método auto-blanco y diluyéndola en 3 medios complejos diferentes que proporcionan niveles de fijación no específica diferentes («suero 1/1.000», «suero 1/100» y «suero 1/10»). La condición de auto-blanco consistió en la captura a un nivel equivalente al anticuerpo B2M-01 de un anticuerpo de isotipo IgG2a que no fija la B2m (clon OKT3, anticuerpo anti-CD3, BD Biosciences).

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar en muestras biológicas complejas en resonancia de plasmón superficial la concentración activa de un analito y, facultativamente, las constantes cinéticas de interacción del analito con un ligando que comprende
- 5 - la provisión de un chip de resonancia de plasmón superficial sobre el que se inmoviliza un agente de captura específico de un ligando del analito;
- la captura por el agente de captura de un ligando testigo que no se une al analito a ensayar;
- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un flujo determinado durante un tiempo determinado;
- la regeneración de la superficie;
- 10 - la captura por el agente de captura de un ligando que se une al analito a ensayar;
- el paso de la muestra sobre el chip inyectada a un mismo flujo determinado durante un mismo tiempo determinado;
- la sustracción del sensograma obtenido con el ligando testigo del sensograma obtenido con el ligando que se une al analito a ensayar; y
- 15 - el cálculo de la concentración activa del analito y, facultativamente, de las constantes cinéticas de interacción del analito con el ligando,
- y donde el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar tienen una masa similar y, el ligando testigo y el ligando que se une al analito a ensayar, son capturados en una cantidad equivalente por el agente de captura.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra biológica compleja se selecciona entre suero, plasma, orinas, líquidos de lavado, ascitis, eluatos de biopsias y medios de cultivo celular.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que la muestra biológica compleja es suero o plasma.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que la muestra se inyecta al menos a dos flujos diferentes y por que se calcula la concentración activa del analito en la muestra biológica compleja.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que la muestra se inyecta a diferentes concentraciones y por que se calculan las constantes cinéticas de interacción del analito con el ligando en la muestra biológica compleja.
- 25 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que la pareja analito-ligando se elige entre una pareja anticuerpo-antígeno, una pareja ligando/receptor, una pareja xenobiótico/diana molecular.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado por que el analito es un anticuerpo anti-HLA, el ligando testigo es un antígeno HLA no reconocido por el anticuerpo a ensayar y el ligando que se une al analito a ensayar es un antígeno HLA diana del anticuerpo a ensayar.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, caracterizado por que la muestra es sometida a uno o varios tratamientos previos seleccionados entre un tratamiento térmico, un tratamiento con ditioneitol (DTT), una etapa de purificación de las IgG sobre una resina de proteína G, una etapa de concentración de la muestra, una etapa de diálisis, en particular con un umbral de corte (cut-off) de 100 kDa, y una combinación de varios de estos tratamientos.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que la muestra es sometida previamente a una combinación de un tratamiento térmico y una etapa de purificación de las IgG sobre una resina de proteína G.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, caracterizado por que el método comprende una etapa previa en la que se detectan los anticuerpos anti-HLA en la muestra.

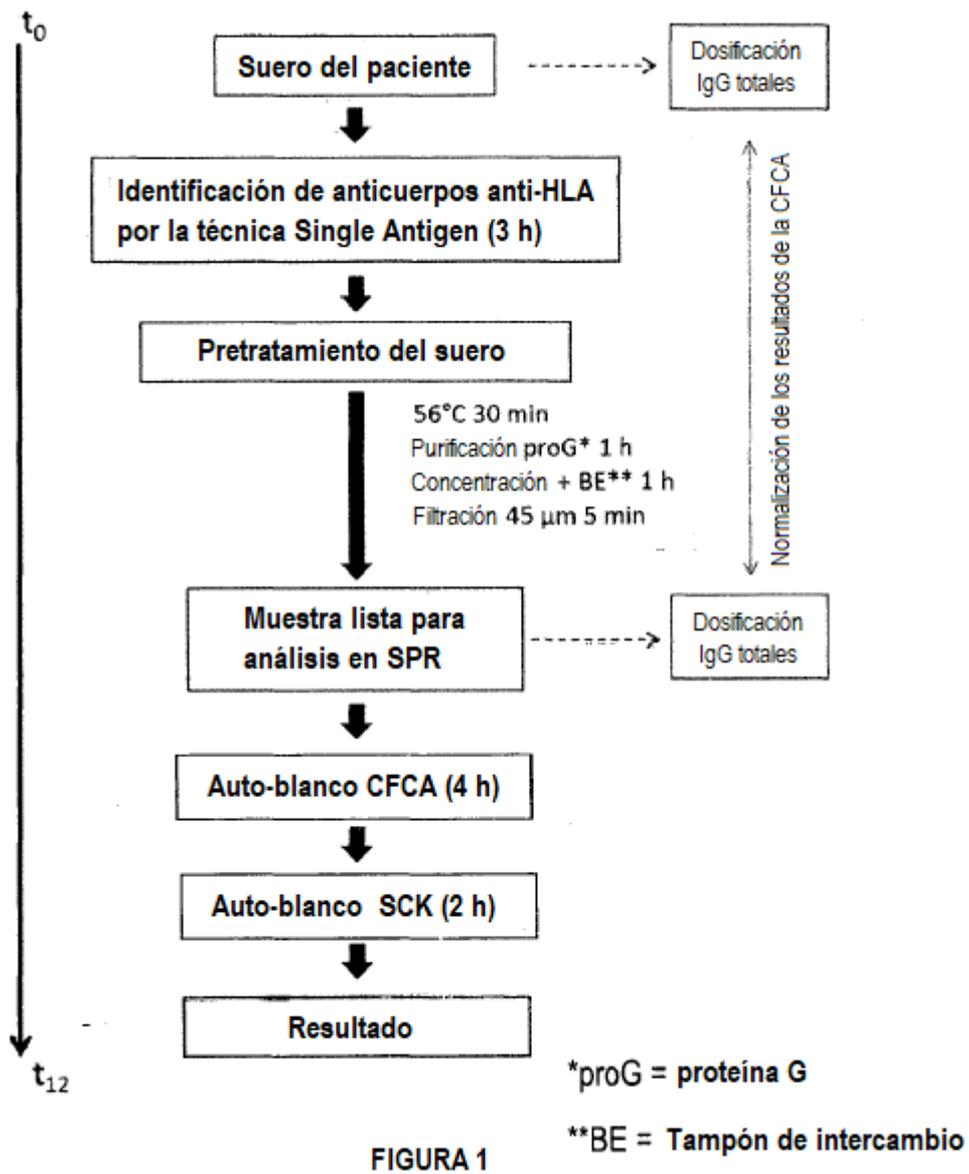


FIGURA 1

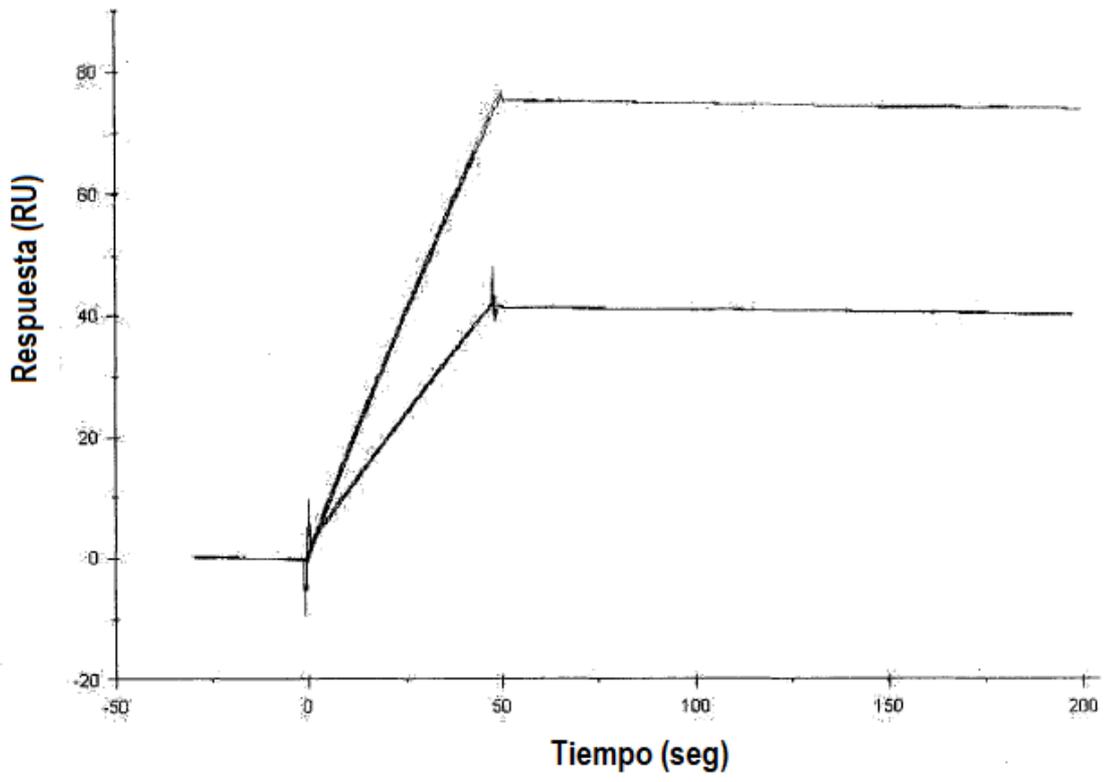


FIGURA 2

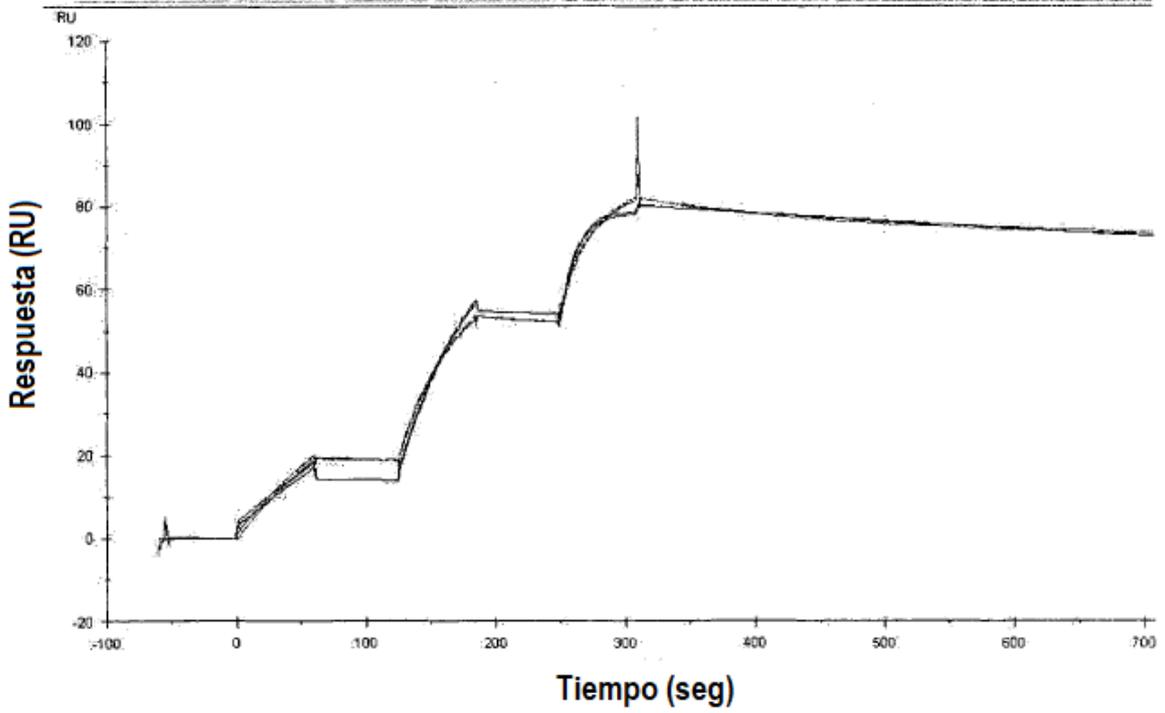


FIGURA 3

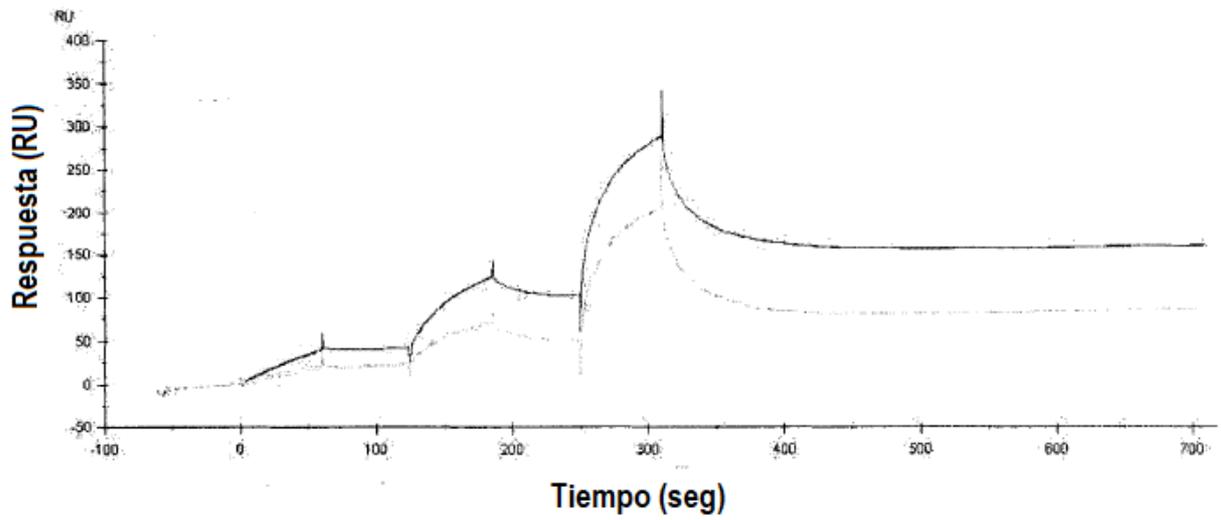
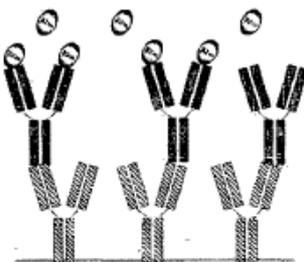


FIGURA 4

Ensayo

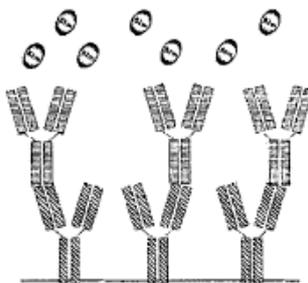


B2m

Ac anti-B2m
(B2M-01, ratón
isotipo IgG2a)

Anticuerpo anti-IgG2a
de ratón (R11-89)

Auto-blanco



B2m

Ac que no fija B2m
(OKT3, ratón
isotipo IgG2a)

Anticuerpo anti-IgG2a
de ratón (R11-89)

FIGURA 5

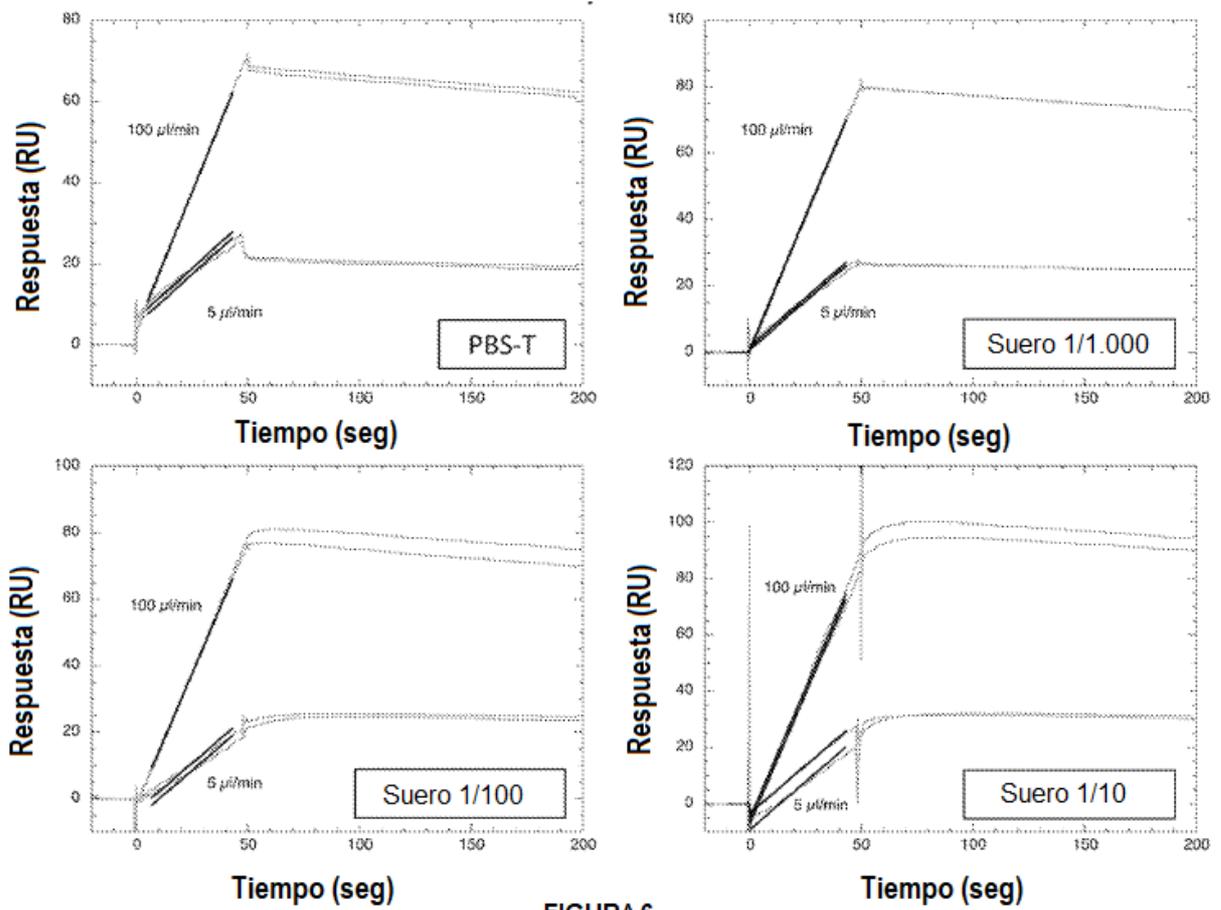


FIGURA 6