

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 014**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2017** **PCT/EP2017/065219**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017** **WO17220645**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2017** **E 17737492 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022** **EP 3475699**

54 Título: **Ensayos farmacocinéticos mejorados para dominios variables individuales de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

23.06.2016 US 201662353784 P

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

21.10.2022

73 Titular/es:

**ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**SNOECK, VEERLE;
BONTINCK, LIESELOT;
POELMANS, SOFIE;
MORTIER, KJELL;
BUYSE, MARIE-ANGE;
DEKEYZER, LIES y
BAUMEISTER, JUDITH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 926 014 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

Ensayos farmacocinéticos mejorados para dominios variables individuales de inmunoglobulina

La presente invención se refiere generalmente a ensayos farmacocinéticos mejorados para medir niveles de dominios variables individuales de inmunoglobulina (también denominados en la presente "ISV" o "ISVD") y de proteínas y polipéptidos que comprenden al menos un ISV (según se describe adicionalmente en la presente) en muestras biológicas.

En particular, la invención se refiere a métodos mejorados para realizar estos ensayos.

Otros aspectos, realizaciones, usos y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la descripción adicional posterior.

En el desarrollo de fármacos, el análisis farmacocinético (PK) del fármaco se realiza para determinar el destino del fármaco (p. ej., la distribución, la absorción y/o la secreción) después de la administración a un animal o un ser humano. Generalmente, este análisis implica determinar la presencia, el nivel o la concentración del fármaco en una muestra biológica obtenida de un sujeto (como sangre, suero o plasma), a menudo en múltiples momentos.

Con este fin, se usan ensayos farmacocinéticos, y los métodos y la técnicas para realizar estos ensayos son conocidos generalmente por los expertos. Generalmente, los métodos habituales para realizar ensayos farmacocinéticos implican las etapas de poner en contacto la muestra con un agente de captura que puede unirse al compuesto que se va a medir (es decir bajo tales condiciones que dicho agente de captura pueda capturar el compuesto que se va a medir) y a continuación determinar la cantidad de compuesto que se va a medir que ha sido capturado por el agente de captura (que sirve como una medida de la cantidad de compuesto en la muestra). En la práctica, a menudo se usa una configuración de "sándwich", en la que el agente de captura está inmovilizado sobre una superficie (tal como la superficie de una placa de múltiples pocillos o un chip) y la cantidad de compuesto capturado por el agente de captura se determina al añadir un agente de detección que puede generar una señal que pueda ser detectada y/o medida. En ensayos PK cuantitativos, la intensidad de esta señal es una medida de la cantidad del compuesto que se va a medir que ha sido capturado por el agente de captura, que a su vez es una medida de la cantidad de compuesto que se va a medir en la muestra de partida.

Según se menciona, técnicas adecuadas para realizar estos ensayos (tales como ELISA, la plataforma MSD de MesoScale Diagnostic LLC, la plataforma Gyrolab™ de Gyros AB y la plataforma Singulex™ de Merck Millipore) son muy conocidas en la técnica. A menudo, el agente de captura es un anticuerpo (policlonal pero preferiblemente monoclonal) que se puede unir a (y a menudo se ha generado específicamente contra) el compuesto que se va a medir (aunque la presente invención también prevé el uso de otros agentes de captura, como ISVD o la diana del compuesto que se va a medir; véanse, por ejemplo, las Figuras 2, 4 y 5 y la descripción adicional de la presente). El agente de detección puede ser cualquier agente adecuado que se pueda usar para proporcionar una señal detectable/medible. Por ejemplo, el agente de detección puede ser un anticuerpo (preferiblemente monoclonal) contra el compuesto que se va a medir que se ha conjugado con un marcador o una etiqueta detectable. Algunos ejemplos no limitativos que se usan a menudo en la práctica incluyen marcadores fluorescentes, un marcador o etiqueta que se pueda detectar usando técnicas de electroquimioluminiscencia (como los marcadores SULFO-TAG™ basados en rutenio usados como parte de la plataforma MSD), o peroxidasa de rábano picante u otra enzima que pueda convertir un sustrato en un producto detectable/medible. Como se sabe bien para los inmunoensayos de tipo sándwich (como ELISA de tipo sándwich), también es posible usar, como el agente de detección, una combinación de un anticuerpo de detección que se une al compuesto que se va a medir y un anticuerpo secundario ligado a una enzima que pueda catalizar la conversión de un sustrato en un producto detectable. Para una descripción general de estas técnicas y técnicas similares, se hace referencia a los manuales estándar, así como, por ejemplo, a 'O Kennedy y cols., Biochemical Education 18(3), 1990, y Gan y Patel, Journal of Investigative Dermatology (2013), 133, e12. doi:10.1038/jid.2013.287 (publicación digital).

Las Figuras 1 a 6 muestran esquemáticamente algunas configuraciones preferidas, pero no limitativas, para realizar ensayos farmacocinéticos del tipo previsto por la presente solicitud.

En la Figura 1 y en las otras Figuras, la invención se ilustra al usar una construcción de ISVD bivalente (es decir que comprende dos ISVD que están cada uno representado por un óvalo y que en las construcciones ilustradas están conectados entre sí a través de un conector adecuado representado por una línea sólida) como el compuesto que se va a medir (indicado como (1) en cada una de las Figuras 1-6). Se debe apuntar que, como se describe adicionalmente en la presente, la elección de esta construcción de ISVD bivalente tiene solamente fines ilustrativos y que la invención se puede aplicar generalmente a cualquier ensayo para determinar la cantidad en una muestra biológica de cualquier proteína, polipéptido u otro compuesto o construcción que comprenda al menos un ISVD (y en particular que, según se describe en la presente, comprenda al menos un ISVD con un extremo C-terminal expuesto, es decir tal que dicho extremo C-terminal – y por extensión, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción – tenga riesgo de unirse a anticuerpos preexistentes de la muestra mientras se esté realizando el ensayo). Otros ejemplos de estas proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones estarán claros para el experto basándose en la divulgación de

la presente y, según se menciona en la presente, incluyen polipéptidos o construcciones de ISVD monovalentes, bivalentes, trivalentes, monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos y/o biparatópicos (por ejemplo, en el Ejemplo 1, se usa ALX-0171, una construcción de Nanobody trivalente contra RSV).

5 En el ensayo de la Figura 1, se usa un anticuerpo monoclonal (2), conectado a un soporte sólido (4) a través de un enlace covalente u otro conector o técnica de inmovilización (3) adecuado para capturar el compuesto que se va a medir (1). Después de retirar cualquier compuesto (1) no unido (es decir, mediante lavado), se determina la cantidad de compuesto (1) capturada por el anticuerpo monoclonal (2) al añadir el agente de detección, que en la configuración mostrada en la Figura 1 es un anticuerpo monoclonal (5) conjugado con un marcador detectable (6) a través de un conector (7) u otra técnica de conjugación adecuada (tal como un par estreptavidina-biotina). A continuación, se retira cualquier agente de detección en exceso (es decir, de nuevo mediante lavado), después de lo cual se determina la cantidad de agente de detección unido al compuesto (1) capturado por el agente de captura, usando la señal proporcionada por el marcador detectable (6).

15 La configuración de ensayo mostrada en la Figura 2 es esencialmente la misma que la configuración mostrada en la Figura 1, excepto que, en lugar de un anticuerpo monoclonal contra el compuesto (1), la diana (8) del compuesto (1) se inmoviliza sobre el soporte sólido (4) (es decir usando el conector (3)).

20 En la configuración de ensayo mostrada en la Figura 3, el compuesto que se va a medir (1) es capturado de nuevo por el anticuerpo monoclonal (2) conectado al soporte sólido (4), pero en este caso el ensayo se realiza en presencia de la diana (soluble) (8) de la construcción de Nanobody (1) que se va a medir, y el agente de detección (que comprende el anticuerpo monoclonal (5) y el marcador detectable (6), conectado por el conector (7)) se dirige hacia la diana (8) en lugar del compuesto (1).

25 La configuración de ensayo mostrada en la Figura 4 es esencialmente la misma que la configuración mostrada en la Figura 3, excepto que se usa un "ISVD anti-ISVD" (9) (p. ej. un Nanobody dirigido contra las secuencias marco de VHHs) como el agente de captura en lugar de un anticuerpo monoclonal.

30 La configuración de ensayo mostrada en la Figura 5 es esencialmente la misma que la configuración mostrada en la Figura 2, excepto que, en lugar del anticuerpo monoclonal (5), se usa una combinación de un ISVD anti-ISVD (10) biotinilado (11) y estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (12) como el agente de detección.

35 La configuración de ensayo mostrada en la Figura 6 es esencialmente la misma que la configuración mostrada en la Figura 2, excepto que, como el agente de detección, se usa una combinación de un anticuerpo de detección (13) y un anticuerpo secundario marcado (5)/(6)/(7).

40 Configuraciones de ensayo adecuadas distintas a las descritas explícitamente en las Figuras estarán claras para el experto basándose en la divulgación y los ejemplos de la presente y, según se menciona, los ensayos mostrados en las Figuras 1-6 y ensayos similares se pueden realizar usando técnicas y metodología generalmente conocidas que estarán claras para el experto basándose en la divulgación de la presente.

45 En el documento WO 12/175741, se describe que se puede producir una interferencia proteínica en algunos ensayos (tales como, por ejemplo, en inmunoensayos de ADA) que se usan para analizar muestras biológicas (tales como muestras de sangre incluyendo sangre entera, suero y plasma, líquido ocular, líquido broncoalveolar/BALF, líquido cefalorraquídeo u otras muestras de líquidos biológicos) que contienen ISVD, y que esta interferencia proteínica puede dar lugar a una señal inespecífica en algunos de estos ensayos y/o para algunas de estas muestras. El documento WO 12/175741 también menciona que esta interferencia proteínica se puede producir no solo en muestras que se obtienen de sujetos que se han tratado con un ISVD y/o a los que se ha administrado un ISVD (tales como pacientes o sujetos de estudios clínicos), sino también en muestras procedentes de sujetos que nunca han recibido un ISVD. Como se menciona adicionalmente en el documento WO 12/175741, esto indica que esta interferencia se debe probablemente a una interacción inespecífica proteína-proteína con proteínas preexistentes en lugar de con cualesquiera ADA emergentes. El documento WO 12/175741 indica además que estos factores interferentes son lo más probablemente IgG (preexistentes) que se pueden unir al extremo C-terminal de un dominio variable, si está expuesto (véanse además, por ejemplo, el documento WO 13/024069, Holland y cols., J. Clin. Immunol. 2013, 33(7):1192-203 y el documento WO 2015/173325).

50 Como los ensayos farmacocinéticos implican generalmente el uso de muestras de suero (es decir procedentes de sujetos a los que se ha administrado un ISVD o un fármaco que comprende un ISVD), es posible que estos "anticuerpos preexistentes" con un extremo C-terminal expuesto de un ISVD, cuando estén presentes en estas muestras, puedan interferir con dicho ensayo. En vista de esto, la invención se dirige a proporcionar ensayos farmacocinéticos mejorados y métodos para realizar los mismos en los que se reduzca esta interferencia (y/o el riesgo de que se produzca esta interferencia).

65 Generalmente, la invención resuelve el problema de una posible interferencia proteínica al realizar el ensayo en presencia de (una cantidad suficiente de) un "desactivador", es decir una proteína o polipéptido al que se pueden unir cualesquiera anticuerpos preexistentes que estén presentes en la muestra. Como resultado, los factores interferentes

no (o ya no) son capaces de interferir con la asociación entre el agente de captura, el compuesto que se va a medir y el agente de detección (es decir de una manera que pueda afectar a o alterar el ensayo).

Generalmente, según se describe adicionalmente en la presente, los desactivadores usados en la presente son ISVD o proteínas y polipéptidos que comprenden un ISVD con un extremo C-terminal expuesto, ISVD, una proteína o polipéptidos que son adicionalmente tales que no puedan ser capturados por el agente de captura y no se unan al compuesto que se va a medir o al agente de detección.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la cantidad y/o concentración en una muestra de al menos un ISVD, o de una proteína, polipéptido u otro compuesto o construcción que comprende al menos un ISVD (proteína, polipéptido u otro compuesto o construcción que es como se describe en la presente), método que comprende las etapas de;

a) poner en contacto la muestra con un agente de captura, de modo que el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción sea capturado por dicho agente de captura;

b) poner en contacto el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción capturado por el agente de captura con un agente de detección, de modo que dicho agente de detección se una al ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción capturado por el agente de captura;

c) generar una señal correspondiente a la cantidad de agente de detección unido al ISVD, la proteína, el compuesto polipeptídico o la construcción que ha sido capturado por el agente de captura, en el que dicho método se realiza en presencia de un desactivador, siendo dicho desactivador una proteína o un polipéptido a los que se pueden unir (es decir, unir específicamente) anticuerpos preexistentes pero a los que (esencialmente) no se puede unir el agente de captura ni el agente de detección (es decir unión distinta a la inespecífica). A este fin, el desactivador es preferiblemente como se describe adicionalmente en la presente.

Como estará claro para el experto basándose en la divulgación de la presente, generalmente, en el método descrito anteriormente, la muestra será una muestra de un líquido biológico que se sabe que contiene y/o se sospecha que contiene anticuerpos preexistentes que se dirigen contra el extremo C-terminal expuesto de un ISVD. En particular, la muestra será una muestra de un líquido biológico que se sabe que contiene y/o se sospecha que contiene anticuerpos preexistentes que se dirigen contra el extremo C-terminal expuesto de un ISVD (y en particular contra un Nanobody u otro ISVD que sea o se haya derivado de un dominio VH o VHH).

La muestra contendrá además el (al menos un) ISVD, proteína, polipéptido, compuesto o construcción que se va a medir. En particular, dicho ISVD, proteína, polipéptido, compuesto o construcción que se va a medir puede ser un ISVD, proteína, polipéptido, compuesto o construcción que se ha administrado al sujeto del que se ha obtenido la muestra, es decir como parte de un estudio clínico o con fines terapéuticos o de diagnóstico. En un aspecto, la muestra se ha obtenido a fin de determinar las propiedades farmacológicas del ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir, y en particular sus propiedades farmacocinéticas (p. ej. sus parámetros PK o de semivida sérica).

La muestra puede ser cualquier muestra deseada y adecuada de un líquido biológico obtenido de un sujeto, tal como una muestra de sangre entera, suero, plasma, líquido linfático, líquido ocular, líquido broncoalveolar/BALF, líquido cefalorraquídeo u otro líquido biológico (tal como esputo o lavados nasales); y en particular una muestra de sangre entera, suero o plasma. Dicha muestra también se puede preparar/haber preparado adecuadamente para el uso en el ensayo de la invención (por ejemplo, mediante métodos de dilución o extracción adecuados si es apropiado, y/o mediante una o más etapas de pretratamiento adecuadas conocidas de por sí en la técnica, tales como una etapa de disociación de ácido adecuada). En la práctica, habitualmente, se sabrá que la muestra contiene, o se espera que contenga, una cierta cantidad del ISVD, la proteína, el compuesto polipeptídico o la construcción que se va a medir, por ejemplo debido a que – según se menciona en la presente – dicha muestra se ha obtenido de un sujeto al que se ha administrado dicho ISVD, proteína, compuesto polipeptídico o construcción.

El ISVD, la proteína, el compuesto polipeptídico o la construcción que se va a medir usando el ensayo de la invención puede comprender o consistir esencialmente en un ISVD monovalente o puede ser una proteína, un polipéptido, un compuesto o una construcción que comprenda o consista esencialmente en uno o más (tal como uno, dos, tres, cuatro o cinco) ISVD. Estos pueden incluir, por ejemplo, proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones que comprenden al menos un (tal como uno, dos o tres) ISVD, y opcionalmente uno o más de otros restos o entidades, adecuadamente conectados entre sí, por ejemplo a través de una conexión química directa o usando uno o más conectores adecuados. Se hace referencia a la descripción adicional y a la técnica anterior mencionada en la presente.

En un aspecto, en estas proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones, al menos uno de los ISVD presentes estarán dirigidos contra una diana terapéuticamente pertinente. En un aspecto específico, estas proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones tendrán una semivida en el hombre (expresada como t_{1/2}-beta) de al

menos un día, tal como al menos tres días, por ejemplo hasta 5 días o más. A este fin, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción puede contener un resto, un dominio de unión o una unidad de unión que provea a el al menos un ISVD "terapéutico" de este incremento de la semivida. Este puede ser, por ejemplo, un ISVD contra una proteína sérica (humana) tal como contra albúmina sérica (humana). Se hace referencia a la divulgación adicional de la presente.

En otro aspecto, estas proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones comprenderán al menos un ISVD contra una proteína sérica (humana) tal como albúmina sérica (humana), para lo que de nuevo se hace referencia a la divulgación adicional de la presente. Generalmente, en este aspecto, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción contendrá además habitualmente al menos un resto terapéuticamente activo, dominio de unión o unidad de unión, tal como uno o más dominios de unión o unidades de unión (incluyendo de nuevo ISVD tales como Nanobodies) contra una o más dianas terapéuticamente pertinentes. En estas proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones, el ISVD que se une a albúmina sérica se usará generalmente para incrementar la semivida del uno o más restos o entidades terapéuticos. De nuevo, estas proteínas, polipéptidos, compuestos o construcciones tendrán una semivida en el hombre (expresada como t_{1/2}-beta) de al menos un día, tal como al menos tres días, por ejemplo hasta 5 días o más.

Las proteínas y los polipéptidos mencionados en la presente son preferiblemente proteínas de fusión. En un aspecto, las proteínas y los polipéptidos comprenden o consisten esencialmente en ISVD, opcionalmente conectados a través de uno o más conectores adecuados.

Generalmente, en la invención, el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir será tal que comprenda al menos un ISVD (tal como un ISVD contra una diana terapéutica y/o un ISVD que prolongue la semivida tal como un ISVD contra una proteína sérica) que se propenso a, y/o tenga riesgo de, unirse a anticuerpos preexistentes, y en particular a anticuerpos preexistentes contra el extremo C-terminal expuesto de dicho ISVD. A menudo, dicho ISVD estará en el extremo C-terminal de la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir.

En un aspecto particular, el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir será tal que comprenda al menos un ISVD de cadena pesada (es decir un ISVD que es un Nanobody u otro ISVD que es o se ha derivado de un dominio VHH o VH, como se describe adicionalmente en la presente) que es propenso a, y/o tiene riesgo de, unirse a anticuerpos preexistentes, y en particular a anticuerpos preexistentes contra el extremo C-terminal expuesto de dicho ISVD. A menudo, dicho ISVD de cadena pesada estará en el extremo C-terminal de la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir.

El uno o más ISVD presentes en el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir también puede tener una secuencia optimizada para reducir la unión a anticuerpos preexistentes, por ejemplo al tener una extensión C-terminal (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 12/175741) y/o al tener mutaciones del marco que reducen la unión a anticuerpos preexistentes (véase el documento WO 2015/173325).

Para los ISVD, las proteínas, los polipéptidos, los compuestos o las construcciones que se pueden medir usando los métodos y ensayos de la invención, se hace referencia además a la divulgación y la técnica anterior citadas en la presente.

El desactivador usado puede ser cualquier ISVD que tenga un extremo C-terminal expuesto, o cualquier proteína, polipéptido, compuesto o construcción que comprenda al menos un ISVD con un extremo C-terminal expuesto (y en particular, con un ISVD en su extremo C-terminal). Por ejemplo, en un aspecto específico, pero no limitativo, el desactivador comprende dos (o incluso puede comprender tres) ISVD conectados entre sí usando un conector adecuado conocido de por sí.

El desactivador se elegirá de modo que cualesquiera anticuerpos preexistentes de la muestra se puedan unir (específicamente) a él, en particular con una afinidad que sea según se describe en la presente.

Para asegurar que los anticuerpos preexistentes se unan al desactivador (es decir en lugar de a la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir), el desactivador se puede elegir de modo que la afinidad para la interacción de unión entre el desactivador y los anticuerpos preexistentes sea superior/mejor (según se describe en la presente) que la afinidad para la interacción de unión entre la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir y los anticuerpos preexistentes (por ejemplo y sin limitación, cuando la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir contiene una extensión C-terminal y/o mutaciones del marco que reduzcan la unión a anticuerpos preexistentes, esto se puede conseguir fácilmente al elegir un desactivador que no contenga esta extensión C-terminal ni estas mutaciones).

Así, en un aspecto no limitativo, el desactivador usado en los métodos de la invención se elige de modo que la afinidad para la interacción de unión entre el desactivador y los anticuerpos preexistentes sea al menos 10 veces (tal como al menos 100 veces) superior/mejor (según se describe en la presente) que la afinidad para la interacción de unión entre la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir y los anticuerpos preexistentes (en

(generalmente, en el contexto de la presente solicitud, a modo de ilustración, una afinidad de 10 nM se considera 10× "mejor" o "superior" que una afinidad de 100 nM).

Como se describe adicionalmente en la presente, con el fin de comparar afinidades como se describe en los párrafos previos, la afinidad para la interacción de unión entre el desactivador y el anticuerpo 21-4 (que se puede usar como modelo/sustituto para anticuerpos preexistentes) se puede comparar con la afinidad para la interacción de unión entre la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir y el anticuerpo 21-4. Así, en un aspecto específico pero no limitativo, en los métodos de la invención, el desactivador se puede elegir de modo que la afinidad para la interacción de unión entre el desactivador y el anticuerpo 21-4 sea mejor/superior (según se define en la presente, y en particular al menos 10 veces mejor tal como al menos 100 veces mejor) que la afinidad para la interacción de unión entre la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir y el anticuerpo 21-4.

Otro modo de asegurar que los anticuerpos preexistentes se unan al desactivador (es decir mejor que a la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir) es usar un exceso adecuado (tal como un exceso de al menos 10 veces, por ejemplo un exceso de al menos 100 veces) en comparación con la cantidad de proteína, polipéptido, compuesto o construcción que se va a medir que se espera (máximamente) que esté presente en la muestra. Generalmente, este exceso adecuado se debe usar cuando (se espera que) la afinidad para la interacción de unión entre el desactivador y los anticuerpos preexistentes sea aproximadamente la misma o incluso peor/inferior que la afinidad para la interacción de unión entre la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir y los anticuerpos preexistentes (generalmente, en el contexto de la presente solicitud, a modo de ilustración, una afinidad de 100 nM se considera 10× "peor" o "inferior" que una afinidad de 10 nM). Además, también se puede usar un exceso adecuado de desactivador cuando (se espera que) la afinidad para la interacción de unión entre el desactivador y los anticuerpos preexistentes sea mejor que la afinidad para la interacción de unión entre la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir y los anticuerpos preexistentes.

Preferiblemente, el desactivador (y en particular el ISVD en el desactivador al que se pretende que se unan los anticuerpos preexistentes) no tiene optimización de secuencia para reducir la unión a anticuerpos preexistentes. Por ejemplo, puede terminar con la secuencia VTVSS sin extensión C-terminal, y preferiblemente tampoco contiene mutaciones que estén destinadas a reducir la unión a anticuerpos preexistentes. Aparte de eso, y se puede usar un ISVD o proteína, polipéptido, compuesto o construcción que comprenda un ISVD con un extremo C-terminal expuesto, con la condición de que no interfiera con el ensayo (por ejemplo, debido a que se pueda unir a, y/o se una a, cualquiera de los otros componentes usados en el ensayo).

En la práctica, con respecto a la (posible) unión del desactivador a anticuerpos preexistentes y también con respecto a la selección de un desactivador adecuado al que se puedan unir anticuerpos preexistentes, se apunta que es posible que los anticuerpos preexistentes en una muestra puedan formar una población policlonal heterogénea y que también es posible que los anticuerpos preexistentes (y sus afinidades para ISVD) también puedan diferir a veces de muestra a muestra y de sujeto a sujeto.

Para explicar esto, en la invención, la unión (es decir la afinidad) al clon de anticuerpo monoclonal de ratón "21-4-3" (también denominado en la presente "21-4" o "ABH0015") se puede usar como un modelo/una herramienta para determinar si un posible desactivador se unirá o no a anticuerpos preexistentes. 21-4-3 (y el hibridoma que lo produce, también llamado "ABH0015") se conoce del documento WO 12/175741 (véase la página 19, líneas 3-28) donde se describe y usa un sustituto/modelo para determinar si una proteína o polipéptido que contiene un ISVD con un extremo C-terminal expuesto tendrá una tendencia a sufrir interferencia proteínica (es decir unirse a anticuerpos preexistentes que puedan estar presentes en una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto). El documento WO 12/175741 también da las secuencias de VH y VL de ABH0015 (véase el documento WO 12/175741, SEQ ID NOs: 35 y 36). Según se menciona en el Ejemplo 7 del documento WO 12/175741, 21-4 se generó usando tecnología de hibridomas partiendo de un ratón inmunizado con la construcción del Nanobody de SEQ ID NO:98 en el documento WO 2006/122825, y una línea celular de hibridoma (llamada "ABH0015") que expresa 21-4 se ha depositado el 4 de junio de 2012 en las BCCM, Ghent, Bélgica, bajo el número de registro LMBP-9680-CB. Según se muestra en el Ejemplo 8 del documento WO 12/175741, 21-4 monoclonal reconoce el extremo C de la construcción del Nanobody de SEQ ID NO:98 en el documento WO 2006/122825, extremo C-terminal que consiste en un Nanobody (VHH humanizado) producido contra factor de Von Willebrand (vWF), y se puede usar a fin de predecir si un ISV tiene una tendencia a sufrir interferencia proteínica inespecífica. En el Ejemplo 9, el documento WO 12/175741 también da un protocolo en el que se usa ABH0015 para predecir/determinar si una proteína o polipéptido (en particular, una proteína o polipéptido que comprende un ISVD con un extremo C-terminal expuesto) tendrá o no tendencia a sufrir interferencia proteínica (es decir unirse a anticuerpos preexistentes que puedan estar presentes en una muestra biológica obtenida de un sujeto).

En la presente invención, la unión a 21-4 se puede usar como un sustituto para medir/determinar si una proteína o polipéptido será adecuado o no para el uso como un desactivador (véase además el Ejemplo 5 de la presente).

Generalmente, en la invención, una proteína o polipéptido será adecuado para el uso como un desactivador si se une a 21-4 con una afinidad (expresada como KD) mejor que 1 micromolar (μM), tal como entre 1000 y 1 nM, cuando se

determine usando BIAcore según el protocolo descrito en el Ejemplo 5 (por motivos de claridad, y por medio de un ejemplo no limitativo, se señala que, generalmente, en la presente descripción de la invención, una afinidad de 1 nM se considera "superior/mejor" que una afinidad de 1 micromolar/1000 nM).

Según se menciona, cuando en los métodos de la invención se pretende usar un desactivador que tenga superior/mejor afinidad para anticuerpos preexistentes que la afinidad con la que el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir se une a anticuerpos preexistentes, entonces, preferiblemente, el desactivador usado se unirá a 21-4 con una afinidad que es un factor 10× (diez veces) superior/mejor, preferiblemente un factor 100× (100 veces) veces superior/mejor, que la afinidad con la que el ISVD, la proteína, el polipéptido, el compuesto o la construcción que se va a medir se une a 21-4 (de nuevo, en este contexto, a modo de ilustración, se considera que una afinidad de 10 nM es 10 veces "superior" que una afinidad de 100 nM).

Así, en un aspecto, la invención se refiere a un método como el descrito anteriormente en la presente, en el que la proteína o el polipéptido usado como el desactivador es una proteína o polipéptido que se une a 21-4 con una afinidad mejor que 1 micromolar (μM), tal como entre 1000 y 1 nM, cuando se determina usando BIAcore según el protocolo descrito en el Ejemplo 5.

El desactivador tampoco se debe unir esencialmente (aparte de la unión inespecífica) al agente de captura o el agente de detección. En la práctica, esto significa que la afinidad del desactivador para el agente de captura y para el agente de detección (o viceversa, la afinidad del agente de captura para el desactivador y la afinidad del agente de detección para el desactivador) debe ser menor/peor que 3 micromolar, preferiblemente menor que 10 micromolar, más preferiblemente menor que 50 micromolar, tal como peor que 100 micromolar (por motivos de claridad, y mediante un ejemplo no limitativo, se señala que, generalmente, en la presente descripción de la invención, se considera que una afinidad de 10 micromolar es "peor/menor" que una afinidad de 1 micromolar). Una vez que se han seleccionado un (posible) agente de captura y un (posible) agente de detección, debe estar dentro de la técnica del experto la determinación de la afinidad de los mismos para un (posible) desactivador y así seleccionar un desactivador que sea adecuado para el uso con el agente de captura y el agente de detección pretendidos.

Así, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método como el descrito anteriormente, en el que la proteína o el polipéptido usado como el desactivador es una proteína o un polipéptido que: (i) se une a 21-4 con una afinidad mejor que 1 micromolar (μM), tal como entre 1000 y 1 nM, cuando se determina usando BIAcore según el protocolo descrito en el Ejemplo 5; y (ii) se une al agente de captura pretendido y al agente de detección pretendido con una afinidad menor/peor que 3 micromolar, preferiblemente menor que 10 micromolar, más preferiblemente menor que 50 micromolar, tal como peor que 100 micromolar.

En la invención, el desactivador usado puede ser un ISVD monovalente (tal como un Nanobody monovalente) o una proteína de fusión o construcción que comprende dos o más (tal como dos o tres) ISVD (de los que al menos uno tiene un extremo C-terminal expuesto). En la práctica, el desactivador será habitualmente un polipéptido, una proteína (de fusión) o una construcción que tiene un ISVD en su extremo C-terminal (ISVD que entonces tendrá un extremo C-terminal expuesto en virtud de la formación del extremo C-terminal del polipéptido, la proteína o la construcción).

Como el desactivador debe poder unirse a anticuerpos preexistentes, el VHH que forma el extremo C-terminal del desactivador preferiblemente no tendrá una extensión C-terminal (como se describe en el documento WO 12/175741) ni mutaciones que estén destinadas a reducir la unión a anticuerpos preexistentes (como las descritas en el documento WO 2015/173325).

Según esto, y preferiblemente, el desactivador es una proteína o un polipéptido que tiene un ISVD (y preferiblemente un Nanobody) en su extremo C-terminal, y (el ISVD que forma el extremo C-terminal de) el desactivador preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos VTVSS (SEQ ID NO:1) en su extremo C-terminal. El desactivador puede ser, por ejemplo, adecuadamente, una construcción de ISVD de construcción monovalente, bivalente, biespecífica, trivalente o triespecífica. Preferiblemente, el desactivador es un Nanobody monovalente, una construcción de Nanobody bivalente (que puede ser monoespecífica o biespecífica) o una construcción de Nanobody trivalente (que puede ser monoespecífica, biespecífica o triespecífica).

Según se muestra en las Figuras 2-6, en algunas posibles configuraciones para el ensayo de la invención, se puede usar la diana para el compuesto que se va a medir (indicada como (8) en las Figuras 2 a 6), bien como parte del agente de captura o bien como parte del agente de detección (o ambos). Según esto, aunque el o los ISVD presentes en el desactivador se puedan dirigir contra cualquier diana o dianas, no se deben dirigir contra la diana del compuesto que se va a medir si dicha diana se usa como parte del ensayo.

Así, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método como el descrito anteriormente en la presente, en el que la proteína o el polipéptido usado como el desactivador es una proteína o un polipéptido que contiene al menos un ISVD que tiene un extremo C-terminal expuesto, en el que el extremo C-terminal de dicho ISVD termina con la secuencia de aminoácidos C-terminal VTVSS (SEQ ID NO:1). De nuevo, dicho desactivador, preferiblemente: (i) se une a 21-4 con una afinidad mejor que 1 micromolar (μM), tal como entre 1000 y 1 nM, cuando se determina usando BIAcore según el protocolo descrito en el Ejemplo 5; y (ii) se une al agente de captura pretendido y al agente de

detección pretendido con una afinidad menor/peor que 3 micromolar, preferiblemente menor que 10 micromolar, más preferiblemente menor que 50 micromolar, tal como peor que 100 micromolar.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método como el descrito anteriormente en la presente, en el que la proteína o el polipéptido usado como el desactivador es una proteína o polipéptido que tiene un ISVD en su extremo C-terminal, en el que dicho ISVD C-terminal (y, como consecuencia, la proteína o el polipéptido usado como el desactivador) termina con la secuencia de aminoácidos C-terminal VTVSS (SEQ ID NO:1). De nuevo, dicho desactivador, preferiblemente: (i) se une a 21-4 con una afinidad mejor que 1 micromolar (μM), tal como entre 1000 y 1 nM, cuando se determina usando BIAcore según el protocolo descrito en el Ejemplo 5; y (ii) se une al agente de captura pretendido y al agente de detección pretendido con una afinidad menor/peor que 3 micromolar, preferiblemente menor que 10 micromolar, más preferiblemente menor que 50 micromolar, tal como peor que 100 micromolar.

Un modo conveniente de usar el desactivador en los métodos de la invención es diluir las muestras que se van a probar (que, como se mencionó anteriormente, ya se pueden haber sometido a una o más etapas de pretratamiento adecuadas conocidas de por sí, tales como una etapa de disociación de ácido) con un tampón de dilución adecuado que contiene (un exceso de) el desactivador antes de la etapa de captura. De este modo, los anticuerpos preexistentes en la muestra se habrán unido al desactivador antes de las etapas de captura y detección, asegurando así que no puedan interferir con la medida y/o la lectura del ensayo.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención se harán evidentes a partir de la descripción adicional de la presente.

En la presente memoria descriptiva:

- el término "dominio variable individual de inmunoglobulina" (también denominado "ISV" o ISVD") se usa generalmente para referirse a dominios variables de inmunoglobulina (que pueden ser dominios de cadena pesada o de cadena ligera, incluyendo dominios VH, VHH o VL) que pueden formar un sitio funcional de unión a antígeno sin interacción con otro dominio variable (p. ej. sin una interacción VH/VL como se requiere entre los dominios VH y VL de un anticuerpo monoclonal tetracatenario convencional). Ejemplos de ISVD serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen Nanobodies (incluyendo un VHH, un VHH humanizado y/o un VH camelizado tal como VH humanos camelizados), IgNAR, dominios, anticuerpos (de un solo dominio) anticuerpos (tales como dAb's™) que son dominios VH o que se derivan de un dominio VH y anticuerpos (de un solo dominio) (tales como dAb's™) que son dominios VL o que se derivan de un dominio VL. A menos que se mencione explícitamente lo contrario en la presente, se prefieren generalmente ISVD que se basan en y/o se derivan de dominios variables de cadena pesada (tales como dominios VH o VHH). Lo más preferiblemente, a menos que se indique explícitamente lo contrario en la presente, un ISVD será un Nanobody.
- el término "Nanobody" es generalmente como se define en los documentos WO 2008/020079 o WO 2009/138519 y, así, en un aspecto específico, indica generalmente un VHH, un VHH humanizado o un VH camelizado (tal como un VH humano camelizado) o generalmente un VHH de secuencia optimizada (tal como, p. ej., optimizada con respecto a la estabilidad química y/o la solubilidad, el solapamiento máximo con regiones marco humanas conocidas y la expresión máxima). Se apunta que los términos Nanobody o Nanobodies son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V. y así también se pueden denominar Nanobody® y/o Nanobodies®);
- Generalmente, a menos que se indique lo contrario en la presente, los ISVD, Nanobodies, polipéptidos, proteínas y otros compuestos y construcciones mencionados en la presente estarán destinados al uso en la profilaxis o el tratamiento de afecciones o trastornos en el hombre (y/u opcionalmente también en animales de sangre caliente y en particular mamíferos). Así, generalmente, los ISVD, Nanobodies, polipéptidos, proteínas y otros compuestos y construcciones descritos en la presente son preferiblemente tales que se puedan usar como, y/o adecuadamente puedan ser parte de, un fármaco (biológico) u otro compuesto farmacéuticamente o terapéuticamente activo y/o de un producto o composición farmacéuticos. Este fármaco, compuesto o producto es preferiblemente tal que sea adecuado para la administración a un ser humano, p. ej. para la profilaxis o el tratamiento de un sujeto que necesite esta profilaxis o tratamiento o, por ejemplo, como parte de un estudio clínico. Como se describe adicionalmente en la presente, a este fin, este fármaco o compuesto puede contener otros restos, entidades o unidades de unión además de los ISVD proporcionados por la invención (que, como también se describe en la presente, pueden ser, por ejemplo, uno o más de otros restos terapéuticos adicionales y/o uno o más de otros restos que influyan en las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del producto biológico basado en ISVD o basado en Nanobody, tales como su semivida). Ejemplos adecuados de estos restos terapéuticos u otros adicionales estarán claros para el experto y, por ejemplo, generalmente pueden incluir cualquier proteína, polipéptido u otro dominio de unión o unidad de unión terapéuticamente activo, así como, por ejemplo, modificaciones tales como las descritas en las páginas 149 a 152 del documento WO 2009/138159. Un producto biológico basado en ISVD o un producto biológico basado en Nanobody es preferiblemente un agente terapéutico o está destinado al uso como un agente terapéutico (lo que incluye profilaxis y diagnóstico) y con este propósito contiene preferiblemente al menos un ISVD contra una diana

terapéuticamente pertinente (tal como, por ejemplo RANK-L, vWF, IgE, RSV, CXCR4, IL-23 u otras interleucinas o sus receptores, etc.). Para algunos ejemplos específicos pero no limitativos de estos productos biológicos basados en ISVD o basados en Nanobody, se hace referencia a los Ejemplos 8 a 18 y también, por ejemplo, a las diversas solicitudes de Ablynx N.V. (tales como, por ejemplo y sin limitación, los documentos WO 2004/062551, WO 2006/122825, WO 2008/020079 y WO 2009/068627), así como, por ejemplo (y sin limitación) a solicitudes tales como los documentos WO 2006/038027, WO 2006/059108, WO 2007/063308, WO 2007/063311, WO 2007/066016 y WO 2007/085814. Además, como se describe adicionalmente en la presente, el resto adicional puede ser un ISVD o Nanobody según se describe en la presente dirigido contra una proteína sérica (humana) tal como albúmina sérica (humana), y este ISVD o Nanobody también puede encontrar usos terapéuticos, en particular en y/o para prolongar la semivida de uno o más ISVD terapéuticos. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 2004/041865, WO 2006/122787 y WO 2012/175400, que describen generalmente el uso de Nanobodies que se unen a albúmina sérica para la prolongación de la semivida. Además, en la presente memoria descriptiva, a menos que se mencione explícitamente lo contrario en la presente, todos los términos mencionados en la presente tienen el significado dado en los documentos WO 2009/138519 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2009/138519) o WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2008/020079). Además, cuando un método o una técnica no se describe específicamente en la presente, se puede realizar según se describe en los documentos WO 2009/138519 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2009/138519) o WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2008/020079). Además, según se describe en la presente, cualquier producto o composición farmacéutico que comprenda cualquier ISVD o compuesto de la invención también puede comprender uno o más componentes adicionales conocidos para el uso en productos o composiciones farmacéuticos (es decir, dependiendo de la forma farmacéutica pretendida) y/o, por ejemplo, uno o más de otros compuestos o principios activos destinados a uso terapéutico (es decir para proporcionar un producto de combinación).

Además, cuando se usan en la presente memoria descriptiva o las reivindicaciones, los siguientes términos tienen el mismo significado que se da en, y/o cuando sea aplicable se pueden determinar del modo descrito en, las páginas 62-75 del documento WO 2009/138519: "*agonista*", "*antagonista*", "*agonista inverso*", "*residuo de aminoácido no cargado apolar*", "*residuo de aminoácido no cargado polar*", "*residuo de aminoácido cargado polar*", "*identidad de secuencias*", "*exactamente la misma*" y "*diferencia de aminoácidos*" (cuando se refiere a una comparación de secuencias de dos secuencias de aminoácidos), "*(en) (forma) esencialmente aislada*", "*dominio*", "*dominio de unión*", "*determinante antigénico*", "*epítipo*", "*contra*" o "*dirigido contra*" (un antígeno), "*especificidad*" y "*semivida*". Además, los términos "*modulación*" y "*modular*", "*sitio de interacción*", "*específico para*", "*bloqueo cruzado*", "*bloqueado de forma cruzada*" y "*bloquear de forma cruzada*" y "*esencialmente independiente del pH*" son como se definen en (y/o se pueden determinar como se describe en) las páginas 74-79 del documento WO 2010/130832 de Ablynx N.V.. Además, cuando se hace referencia a una construcción, un compuesto, una proteína o un polipéptido de la invención, términos como "*monovalente*", "*bivalente*" (o "*multivalente*"), "*biespecífico*" (o "*multiespecífico*") y "*biparatópico*" (o "*multiparatópico*") pueden tener el significado dado en los documentos WO 2009/138519, WO 2010/130832 o WO 2008/020079.

El término "semivida" según se usa aquí en relación con un ISVD, Nanobody, producto biológico basado en ISVD, producto biológico basado en Nanobody o cualquier otra secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido mencionados en la presente se puede definir generalmente como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079 y según se menciona en la presente se refiere al tiempo empleado para que la concentración sérica de la secuencia de aminoácidos, el compuesto o el polipéptido se reduzca en 50%, in vivo, por ejemplo debido a la degradación de la secuencia o el compuesto y/o la depuración o el secuestro de la secuencia o el compuesto por mecanismos naturales. La semivida in vivo de una secuencia de aminoácidos, un compuesto o un polipéptido de la invención se puede determinar de cualquier modo conocido de por sí, tal como mediante análisis farmacocinético. Técnicas adecuadas serán evidentes para el experto en la técnica y pueden ser, por ejemplo, generalmente como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079. Como también se menciona en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079, la semivida se puede expresar usando parámetros tales como el t_{1/2}-alfa, t_{1/2}-beta y la superficie bajo la curva (AUC). A este respecto, se debe apuntar que el término "semivida" según se usa en la presente se refiere en particular al t_{1/2}-beta o la semivida terminal (en los que no se consideran el t_{1/2}-alfa y/o la AUC o ambos). Por ejemplo, se hace referencia a la Parte Experimental posterior, así como a los manuales estándar, tales como Kenneth, A y cols: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y Peters y cols al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición rev. (1982). De forma similar, los términos "incremento en la semivida" o "semivida incrementada" también son como se definen en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079 y en particular se refieren a un incremento en el t_{1/2}-beta, bien con o bien sin un incremento en el t_{1/2}-alfa y/o la AUC o ambos.

Cuando un término no se defina específicamente en la presente, tiene su significado habitual en la técnica, que será evidente para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Sambrook y cols, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel y cols, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old y cols., "Principles of Gene Manipulation: An

Introduction to Genetic Engineering", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt y cols., "Immunology" (6ª Ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt y cols., Roitt's Essential Immunology, 10ª Ed. Blackwell Publishing, Reino Unido (2001); y Janeway y cols., "Immunobiology" (6ª Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica anterior general citada en la presente.

Además, como ya se indicó en la presente, los residuos de aminoácidos de un Nanobody se numeran según la numeración general para VH dada por Kabat y cols. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación Nº 91), según se aplica a dominios VHH para camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods 23 jun 2000; 240 (1-2): 185-195; o se menciona en la presente. Según esta numeración, la FR1 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, la CDR1 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-35, la FR2 de un Nanobody comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, la FR3 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, la CDR3 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102, y la FR4 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113. [A este respecto, se debe apuntar que – como se sabe bien en la técnica para dominios VH y para dominios VHH – el número total de residuos de aminoácido en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácido indicado por la numeración de Kabat (esto es, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácido que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácido en la secuencia real. Generalmente, sin embargo, se puede decir que, según la numeración de Kabat e independientemente del número de residuos de aminoácido en las CDR, la posición 1 según la numeración de Kabat corresponde al principio de la FR1 y viceversa, la posición 36 según la numeración de Kabat corresponde al principio de la FR2 y viceversa, la posición 66 según la numeración de Kabat corresponde al principio de la FR3 y viceversa, y la posición 103 según la numeración de Kabat corresponde al principio de la FR4 y viceversa.].

Métodos alternativos para numerar los residuos de aminoácido de dominios VH, métodos que también se pueden aplicar de modo análogo a dominios VHH procedentes de camélido y a Nanobodies, son el método descrito por Chothia y cols. (Nature 342, 877-883 (1989)), la llamada "definición de AbM" y la llamada "definición de contacto". Sin embargo, en la descripción, los aspectos y las figuras presentes, se seguirá la numeración según Kabat según se aplica a dominios VHH por Riechmann y Muyldermans, a menos que se indique lo contrario.

Se debe apuntar que las Figuras, cualquier Lista de Secuencias y la Parte Experimental/Ejemplos se dan solo para ilustrar adicionalmente la invención y no se debe interpretar o considerar que limiten de ningún modo el alcance de la invención y/o de las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique explícitamente lo contrario en la presente.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes aspectos, ejemplos y figuras preferidos no limitativos, en los que las Figuras 1 a 6 ilustran esquemáticamente diferentes configuraciones para realizar los ensayos farmacocinéticos del tipo que se puede usar en la presente invención (en ningún caso se muestra el desactivador usado en la invención).

A menos que se indique lo contrario, las etapas realizadas en la Parte Experimental posterior se realizaron según las instrucciones del fabricante o de otro modo usando condiciones estándar generalmente conocidas por los expertos.

Ejemplo 1: uso de desactivadores en un ensayo PK que usa la plataforma Mesoscale Discovery™ (MSD).

Este ejemplo ilustra el uso de un desactivador en ensayos farmacocinéticos usados para determinar la concentración total de proteínas (de fusión) basadas en Nanobody en una muestra de suero humano. En este ejemplo, se usa la plataforma Mesoscale Discovery para determinar la concentración de ALX-0171 (una construcción de Nanobody trivalente contra virus sincitial respiratorio humano; véase el documento WO 2010/139808) en muestras de suero humano aderezadas diferentes concentraciones de ALX-0171. La configuración de ensayo es esencialmente como se representa esquemáticamente en la Figura 1 (aunque ALX-0171 sea una construcción de Nanobody trivalente en lugar de la construcción de Nanobody bivalente mostradas con fines ilustrativos en la Figura 1).

El desactivador usado era una construcción de Nanobody trivalente (con una etiqueta de HIS N-terminal y un extremo C-terminal que era la secuencia de SEQ ID NO:1 (es decir sin extensión C-terminal)), cuya secuencia se da en la Figura 7 como SEQ ID No:2.

Un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado que se une a y neutraliza el Nanobody ALX-0171 se usó como el agente de captura (a 5,0 microgramos/ml en PBS/caseína al 0,1%) y se inmovilizó sobre una placa de 96 pocillos múltiple con estreptavidina-oro. Las muestras de suero humano que se iban a probar se diluyeron 50 veces (primeras 5 veces en PBS/caseína al 0,1%, a continuación 5 veces en ácido acético 1000 mM. Después de la incubación durante 60 minutos a TA, dilúyase 2 veces en tampón de Tris 1 M pH 9,5 que contiene 4,0 microgramos de desactivador/ml). Después de una incubación durante la noche a TA, las muestras se aplican (en partes alícuotas de 50 microlitros) a las placas de

96 pocillos revestidas con el agente de captura bajo condiciones estándar que permiten que ALX-0171 sea capturado por el agente de captura.

Después de incubar durante 1 hora y lavar, se añadió el agente de detección (un anticuerpo monoclonal de ratón etiquetado con SULFO que se une a y neutraliza Nanobody ALX-0171) y se dejó que se uniera al ALX-0171 capturado por el agente de captura inmovilizado. Después del lavado, la cantidad de señal electroluminiscente en cada pocillo se midió en los 10 minutos después de la adición del tampón de MSD Read usando un Sector Imager 2400.

Se encontró que ni la presencia de anticuerpos preexistentes en las muestras de suero humano usadas ni la presencia o el uso del desactivador como parte del ensayo afectaban de modo significativo a la determinación de la concentración de ALX-0171 cuando el ALX-0171 se agregaba a las muestras de suero humano a concentraciones conocidas entre 987 pg/ml y 658537 pg/ml. Estas concentraciones se encuentran dentro de un intervalo de concentración general que, entre otras cosas, debe ser representativo de las concentraciones de productos terapéuticos basados en Nanobody que se espera que se encuentren en muestras de suero obtenidas de sujetos humanos durante estudios clínicos que impliquen al producto terapéutico basado en Nanobody (p. ej. con el fin de determinar la PK del producto terapéutico basado en Nanobody), opcionalmente después de una dilución adecuada.

Ejemplo 2: uso de desactivadores en un ensayo PK basado en ELISA.

Este ejemplo ilustra el uso de un desactivador en ensayos farmacocinéticos basados en ELISA usados para determinar la concentración activa total de proteínas (de fusión) basadas en Nanobody en una muestra de suero humano.

En este ejemplo, el Nanobody es una construcción biespecífica dirigida contra el receptor de IL-6 y albúmina sérica humana (véanse los documentos WO 2008/020079 y WO 2009/095489). Como se sabe bien, se sabe que el receptor de IL-6 se presenta tanto en forma unida a la membrana como en forma soluble. El ensayo descrito en este ejemplo es capaz de determinar la concentración activa total incluyendo Nanobody "libre" (es decir no unido a receptor de IL-6 soluble que está presente en la muestra de plasma usada) y Nanobody que está unido a receptor de IL-6 soluble que está presente en la muestra.

La configuración de ensayo es esencialmente como se muestra esquemáticamente en la Figura 4.

El desactivador usado era un Nanobody monovalente (con una etiqueta de HIS N-terminal y un extremo C-terminal que era la secuencia de SEQ ID NO:1 sin extensión C-terminal), cuya secuencia se da en la Figura 7 como SEQ ID No:3.

Un Nanobody bivalente que reconoce el marco o los marcos de Nanobodies se usó como el agente de captura (en 3,0 microgramos/ml en tampón de BICA) y se revistió sobre una placa C96 Maxisorp. Las muestras de suero humano que iban a probarse se diluyeron 200 veces (primeras 20 veces en PBS/caseína al 0,1%, a continuación 5 veces en ácido acético 1600 mM. Después de la incubación durante 90 minutos a TA, dilúyase a continuación 2 veces en tampón de Tris 1 M pH 9,5 que contiene 0,5 microgramos/ml de receptor de sIL-6 humano y 4,0 microgramos de desactivador/ml). Después de 60 min de incubación a TA, las muestras se aplican (en partes alícuotas de 100 microlitros) a las placas de 96 pocillos revestidas con el agente de captura bajo condiciones estándar que permiten que el Nanobody anti-IL-6R sea capturado por el agente de captura.

Después de incubar durante 1 hora y lavar, se añadió una solución de receptor de IL-6 soluble (0,25 microgramos/ml) y se incubó durante 30 min a TA. Después de lavar la placa, se añadió el agente de detección (0,25 µg/ml de un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un epítipo diferente sobre el IL-6R que el Nanobody lo que permite la unión simultánea de anticuerpo y Nanobody) y se dejó que se uniera al IL-6R capturado por el Nanobody, que por su parte está unido al agente de captura inmovilizado. Después del lavado, se añadieron 0,65 µg/ml de un anti(Ig de ratón) de conejo marcado con HRP y se incubaron durante 30 min a TA. Después del lavado, se añadió sustrato de TMB y la señal de OD en cada pocillo se midió a 450 nm usando 620 nm como referencia.

Se encontró que ni la presencia de anticuerpos preexistentes en las muestras de suero humano usadas ni la presencia o el uso del desactivador como parte del ensayo afectaban de modo significativo a la determinación de la concentración del Nanobody anti-IL-6R cuando se agregaba a las muestras de suero humano a concentraciones conocidas entre 20,0 ng/ml y 1483,1 ng/ml. Estas concentraciones se encuentran dentro de un intervalo de concentración general que, entre otras cosas, debe ser representativo de las concentraciones de productos terapéuticos basados en Nanobody que se espera que se encuentren en muestras de suero obtenidas de sujetos humanos durante estudios clínicos que impliquen al producto terapéutico basado en Nanobody (p. ej. con el fin de determinar la PK del producto terapéutico basado en Nanobody), opcionalmente después de una dilución adecuada.

Ejemplo 3: uso de desactivadores en un ensayo PK que usa la plataforma Mesoscale Discovery™ (MSD).

Este ejemplo ilustra el uso de un desactivador en ensayos farmacocinéticos usados para determinar la concentración activa total de proteínas (de fusión) basadas en Nanobody en una muestra de suero humano. En este ejemplo, se usa la plataforma Mesoscale Discovery para determinar la concentración de ALX-0761 (una construcción de Nanobody trivalente contra interleucina 17 A y F) en muestras de suero humano a las que se han agregado diferentes concentraciones de ALX-0761.

La configuración de ensayo es esencialmente como se representa esquemáticamente en la Figura 3. El desactivador usado era un Nanobody monovalente (que tiene un extremo C-terminal que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 sin extensión C-terminal)), cuya secuencia se da en la Figura 7 como SEQ ID No:4.

Un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado que reconoce los marcos de Nanobodies se usó como el agente de captura (a 1,0 microgramos/ml en PBS/caseína al 0,1%) y se inmovilizó sobre una placa de 96 pocillos múltiple con estreptavidina-oro. Las muestras de suero humano que se iban a probar se diluyeron 100 veces (primeras 50 veces, a continuación 2 veces, ambas en PBS/caseína al 0,1%, que contenía 20,0 microgramos de desactivador/ml y 50,0 microgramos de mAb anti-IL-17/ml, que se añadía para evitar que cualquier IL-17 libre interfiriera con el ensayo). Después de una incubación durante la noche a TA, las muestras se aplican (en partes alícuotas de 50 microlitros) a las placas de 96 pocillos revestidas con el agente de captura bajo condiciones estándar que permiten que ALX-0761 sea capturado por el agente de captura.

Después de incubar durante 1 hora y lavar, una solución de IL-17A soluble (2,0 microgramos/ml) se añadió y se incubó durante 1 hora a TA. Después de lavar la placa, se añadió el agente de detección (0,25 µg/ml de un anticuerpo monoclonal de ratón etiquetado con SULFO que se une a la diana IL-17A) y se dejó que se uniera a IL-17A capturada por el Nanobody, que a su vez está unido al agente de captura inmovilizado. Después del lavado, la cantidad de señal electroluminescente en cada pocillo se midió en los 10 minutos después de la adición de tampón de MSD Read usando un Sector Imager 2400.

Se encontró que ni la presencia de anticuerpos preexistentes en las muestras de suero humano usadas ni la presencia o el uso del desactivador como parte del ensayo afectaban de modo significativo a la determinación de la concentración de ALX-0761 cuando el ALX-0761 se agregaba a las muestras de suero humano a concentraciones conocidas entre 99,7 ng/ml y 3280,9 ng/ml. Estas concentraciones se encuentran dentro de un intervalo de concentración general que, entre otras cosas, debe ser representativo de las concentraciones de productos terapéuticos basados en Nanobody que se espera que se encuentren en muestras de suero obtenidas de sujetos humanos durante estudios clínicos que impliquen al producto terapéutico basado en Nanobody (p. ej. con el fin de determinar la PK del producto terapéutico basado en Nanobody), opcionalmente después de una dilución adecuada.

Ejemplo 4: uso de desactivadores en un ensayo PK basado en ELISA.

Este ejemplo ilustra el uso de un desactivador en un ensayo farmacocinético basado en ELISA usado para determinar la concentración de proteínas (de fusión) basadas en Nanobody en una muestra de plasma de ratón.

En este ejemplo, el Nanobody se dirige contra Her3. El ensayo descrito en este ejemplo es capaz de determinar la concentración ALX-0751 que está presente en la muestra.

La configuración de ensayo es esencialmente como se muestra esquemáticamente en la Figura 5.

El desactivador usado era una construcción de Nanobody biespecífica (que tiene un extremo C-terminal que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 sin extensión C-terminal), cuya secuencia se da en la Figura 7 como SEQ ID No:5.

En este ELISA, HER3-ECD (1,5 microgramos/ml en tampón de Trizma NaCl 10:10) está revestido sobre una placa C96 Maxisorp. Las muestras de plasma de ratón que se van a probar se diluyen 20 veces en PBS/caseína al 0,1% que contiene 200 microgramos de desactivador por ml. Después de una incubación de 2 horas a 37°C, las muestras se aplican (en partes alícuotas de 50 microlitros) a las placas de 96 pocillos revestidas con el agente de captura (diana) bajo condiciones estándar que permiten que ALX-0751 sea capturado por el agente de captura.

Después de incubar durante 1 hora y lavar, se añadió un reactivo de detección (1 microgramo/ml de Nanobody biotinilado que reconoce el marco del Nanobody ALX-0751) y se incubó durante 1 hora a TA. Después de lavar, se añade estreptavidina marcada con HRP y se incubó durante 30 min a TA. Después de lavar, se añadió sustrato TMB y la señal de OD en cada pocillo se midió a 450 nm usando 620 nm como referencia.

Se encontró que ni la presencia de anticuerpos preexistentes en las muestras de plasma de ratón usadas ni la presencia o el uso del desactivador como parte del ensayo afectaban de modo significativo a la determinación de la concentración del Nanobody ALX-0751 cuando se agregaba a las muestras de plasma de ratón a concentraciones conocidas entre 24,9 ng/ml y 266,7 ng/ml. Estas concentraciones se encuentran dentro de un intervalo de concentración general que, entre otras cosas, debe ser representativo de las concentraciones de productos

terapéuticos basados en Nanobody que se espera que se encuentren en muestras de plasma obtenidas de ratones durante estudios preclínicos que impliquen al producto terapéutico basado en Nanobody (p. ej. con el fin de determinar la PK del producto terapéutico basado en Nanobody), opcionalmente después de una dilución adecuada.

Ejemplo 5: Protocolo para determinar la afinidad para 21-4.

Se realizaron medidas de unión usando un Biacore T100 usando un chip sensor CM5, con tampón HBS-EP+ corriente, 25°C. 21-4 se capturó a través de anti(IgG de ratón) de conejo inmovilizado, ya que se encontró que la superficie de mAb 21-4 directamente inmovilizado no se podía regenerar eficazmente. El anti-(IgG de ratón) usado eran anticuerpos anti(IgG) de conejo policlonales que reaccionan con todas las subclases de IgG, IgA e IgM (GE Healthcare; n° Cat BR-1008-38; n° Lote 10111487). La inmovilización del anti-(IgG de ratón) se realizó usando un acoplamiento de aminos manual usando una inyección de 7 minutos de EDC/NHS para la activación y una inyección de 7 minutos de HCl de etanolamina 1 M pH 8,5 para la reactivación (Biacore, estuche de acoplamiento de aminos). Las condiciones de unión se listan en la Tabla I. Basándose en el nivel de inmovilización y el PM de las proteínas, la $R_{\text{máx}}$ teórica para la unión de mAb21-4 al anti-(IgG de ratón) inmovilizado era ~13000 RU (cuando una molécula de mAb21-4 se une a una molécula de anti-(IgG de ratón)).

Tabla I

Celda de flujo (FC)	Proteína	Conc. (µg/ml)	Tiempo de contacto (s)	Caudal (µl/min)	Tampón inmovilización de	Nivel de inmovilización (RU)
FC1	Anti-(IgG de ratón)	30	420	5	Acetato 10 mM pH 5,0	17305 (después de la desactivación: 13440)
FC2	Anti-(IgG de ratón)	30	420	5	Acetato 10 mM pH 5,0	17020 (después de la desactivación: 12820)

Las condiciones usadas para el experimento de unión (Biacore T100) usando 21-4 inmovilizado de ese modo se dan en la Figura 8. La superficie del anti-(IgG de ratón) se podía regenerar satisfactoriamente después de la captura de mAb 21-4 y la inyección de todas las muestras (con un incremento limitado para el nivel de referencia después de cada regeneración).

El protocolo anterior se usó para generar los datos de afinidad por 21-4 para diferentes desactivadores según se indica en la Tabla II posterior.

Tabla II

Captura	Desactivador	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
21-4	SEQ ID NO:2	1,0E+04	3,0E-03	3,0E-07
	SEQ ID NO: 3	6,7E+03	3,2E-03	4,8E-07
	SEQ ID NO:4	4,5E+03	4,0E-03	8,9E-07
	SEQ ID NO: 5	9,5E+04	8,2E-04	8,6E-09

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ablynx N.V.

<120> Ensayos farmacocinéticos mejorados para dominios variables individuales de inmunoglobulina

<130> 197447

<150> US62/353.784

<151> 2016-06-23

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Extremo C-terminal de ISVD
 <400> 1
 10 Val Thr Val Ser Ser
 1 5
 <210> 2
 15 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Desactivador
 25 <400> 2
 His His His His His His Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30
 Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 35 40 45
 Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
 50 55 60
 Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 85 90 95

ES 2 926 014 T3

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
 100 105 110
 Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 165 170 175
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 180 185 190
 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln
 195 200 205
 Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly
 210 215 220
 Val Arg Ser Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp Ser Val Lys Asp Arg
 225 230 235 240
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 245 250 255
 Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser
 260 265 270
 Ala Ile Gly Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly
 275 280 285
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 325 330 335
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 340 345 350

ES 2 926 014 T3

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
355 360 365

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
370 375 380

Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
385 390 395 400

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
405 410 415

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
420 425 430

Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440 445

<210> 3

5 <211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Desactivador

15 <400> 3

His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp
1 5 10 15

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
65 70 75 80

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

20 <210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Desactivador

10 <400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 5

15 <211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Desactivador

25 <400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ES 2 926 014 T3

Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Lys	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gly	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Ser	Arg	Val	Ser	Arg	Thr	Gly	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Asn	Arg
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val
	130					135					140				
Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu
145					150					155					160
Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Asn	Asn	Tyr	Ala	Met
				165					170					175	
Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala
			180					185					190		
Ile	Thr	Arg	Ser	Gly	Val	Arg	Ser	Gly	Val	Ser	Ala	Ile	Tyr	Gly	Asp
		195					200					205			
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr
	210					215					220				
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
225					230					235					240
Tyr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Ser	Gly	Ala	Leu	Arg	Arg	Phe	Glu
				245					250					255	
Tyr	Asp	Tyr	Ser	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			260					265					270		

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la cantidad y/o concentración en una muestra de al menos un dominio variable individual de inmunoglobulina (ISVD), o de una proteína o polipéptido que comprende al menos un ISVD, método que comprende las etapas de;

- 5 a) poner en contacto la muestra con un agente de captura, de modo que el ISVD, la proteína o el polipéptido sea capturado por dicho agente de captura;
- b) poner en contacto el ISVD, la proteína o el polipéptido capturado por el agente de captura con un agente de detección, de modo que dicho agente de detección se una al ISVD, la proteína o el polipéptido capturado por el agente de captura;
- 10 c) generar una señal correspondiente a la cantidad de agente de detección unido al ISVD, la proteína o el polipéptido capturado por el agente de captura,

en el que dicho método se realiza en presencia de un desactivador, siendo dicho desactivador una proteína o un polipéptido a los que se pueden unir anticuerpos preexistentes contra un extremo C-terminal expuesto del ISVD pero a los que el agente de captura y el agente de detección se unen con una afinidad de menos/peor que 3 micromolar.

- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína o el polipéptido usado como el desactivador es una proteína o un polipéptido que está unido al anticuerpo monoclonal 21-4 que se expresa por la línea celular de hibridoma LMBP-9680-CB con una afinidad mejor que 1 micromolar (μM), tal como entre 1000 y 1 nM.

- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína o el polipéptido usado como el desactivador es una proteína o un polipéptido que se une al agente de captura pretendido y al agente de detección pretendido con una afinidad de menos/peor que 10 micromolar, más preferiblemente menos que 50 micromolar, tal como peor que 100 micromolar.

- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el desactivador es un dominio variable individual de inmunoglobulina monovalente o una proteína de fusión o construcción que comprende no más de cinco, tal como cuatro, tres, dos o un dominio variable individual de inmunoglobulina.

- 30 5. Método según la reivindicación 4, en el que al menos uno de los dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en el desactivador tiene un extremo C-terminal expuesto.

- 35 6. Método según la reivindicación 5, en el que el al menos un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene un extremo C-terminal expuesto tiene la secuencia VTVSS (SEQ ID NO:1) en su extremo C-terminal.

- 40 7. Método según la reivindicación 4 o 5, en el que al menos el desactivador tiene un dominio variable individual de inmunoglobulina en su extremo C-terminal.

- 40 8. Método según la reivindicación 7, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina en el extremo C-terminal del desactivador (y, por extensión, todo el desactivador) tiene la secuencia VTVSS (SEQ ID NO:1) en su extremo C-terminal.

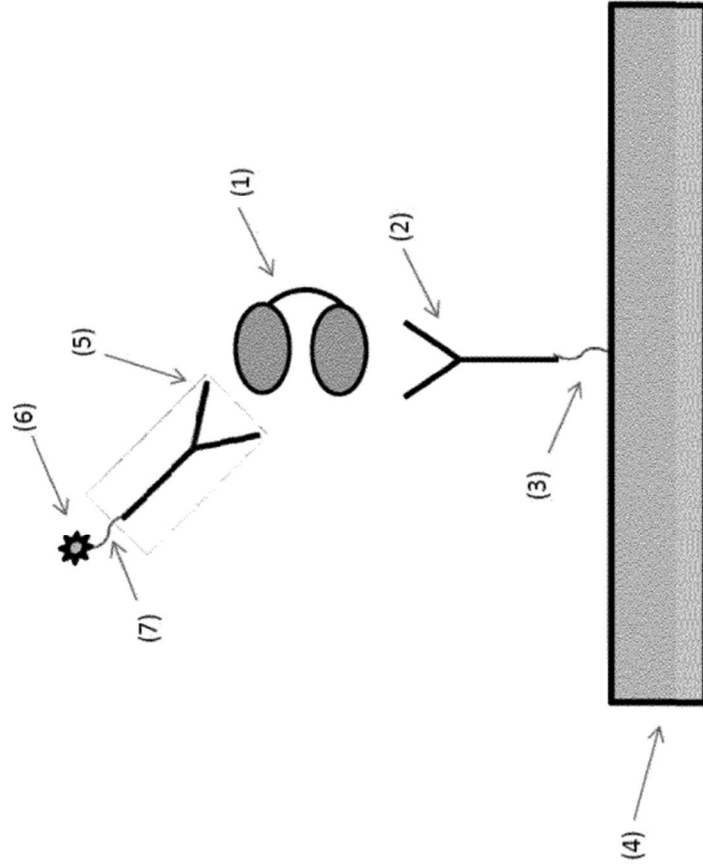


Figure 1

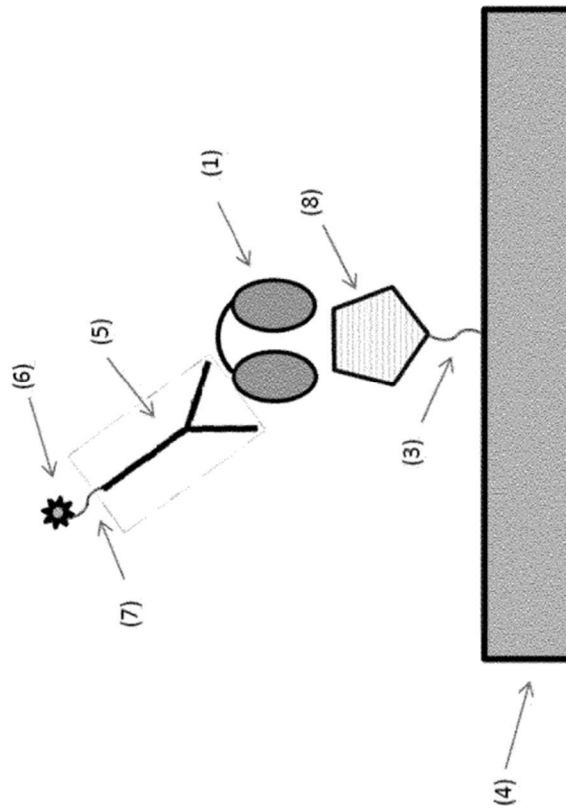
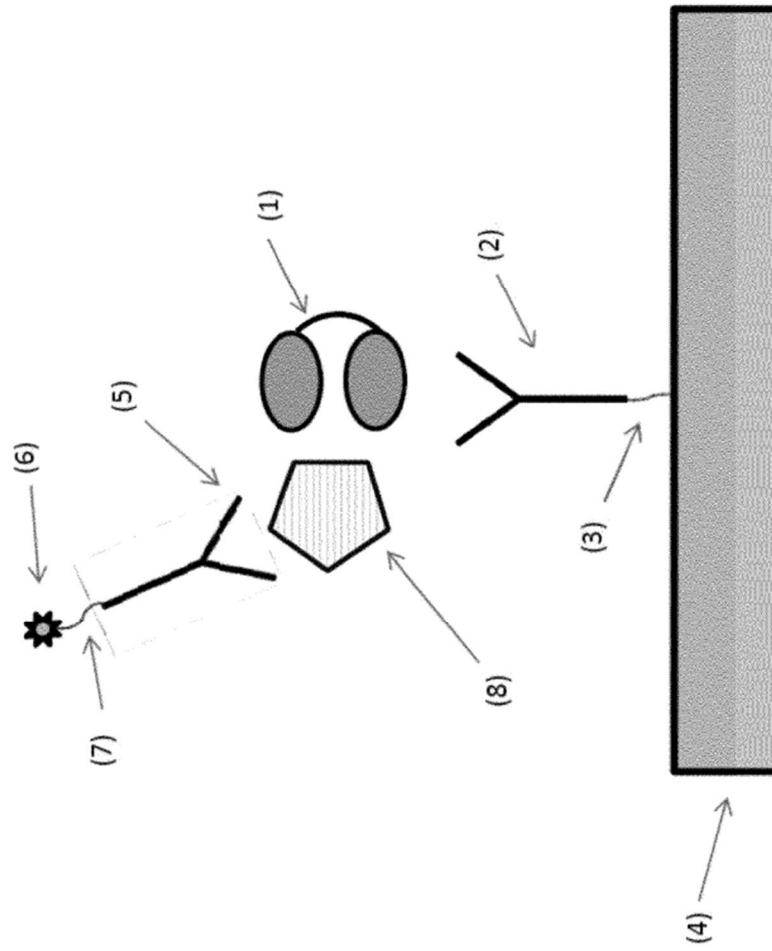


Figura 2

Figura 3



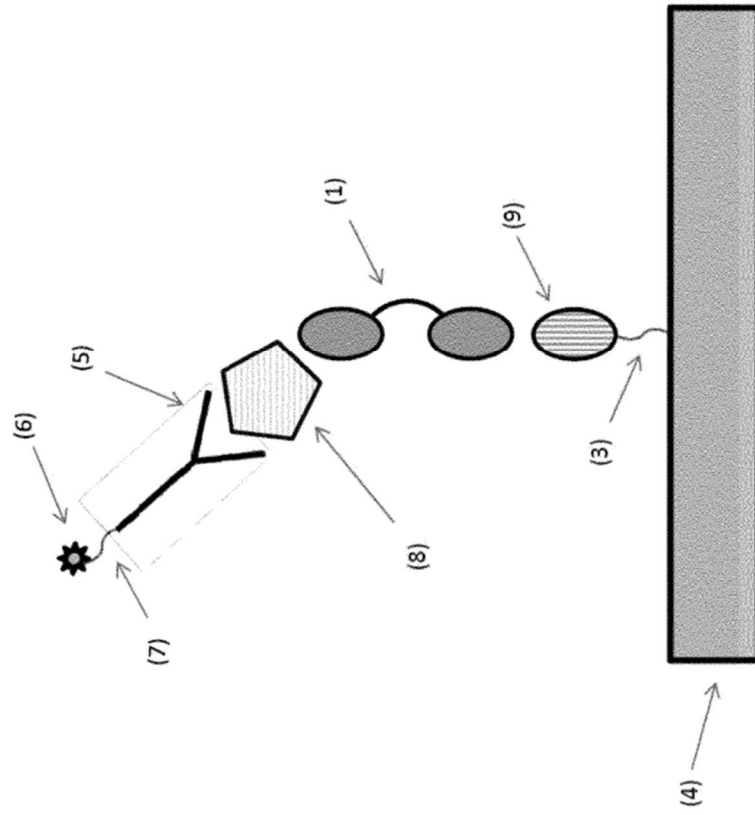


Figura 4

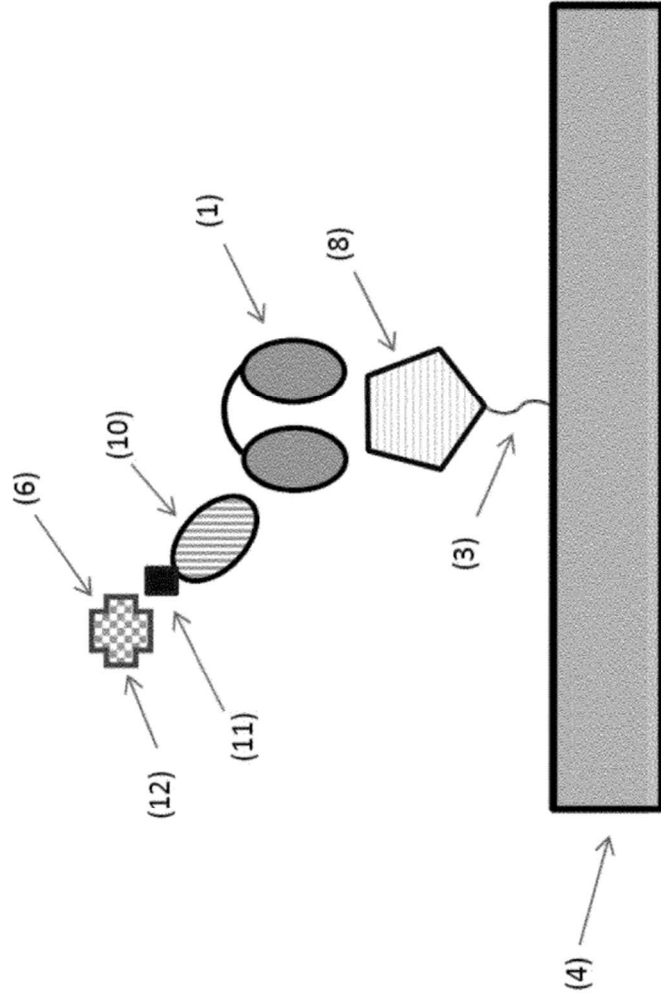


Figura 5

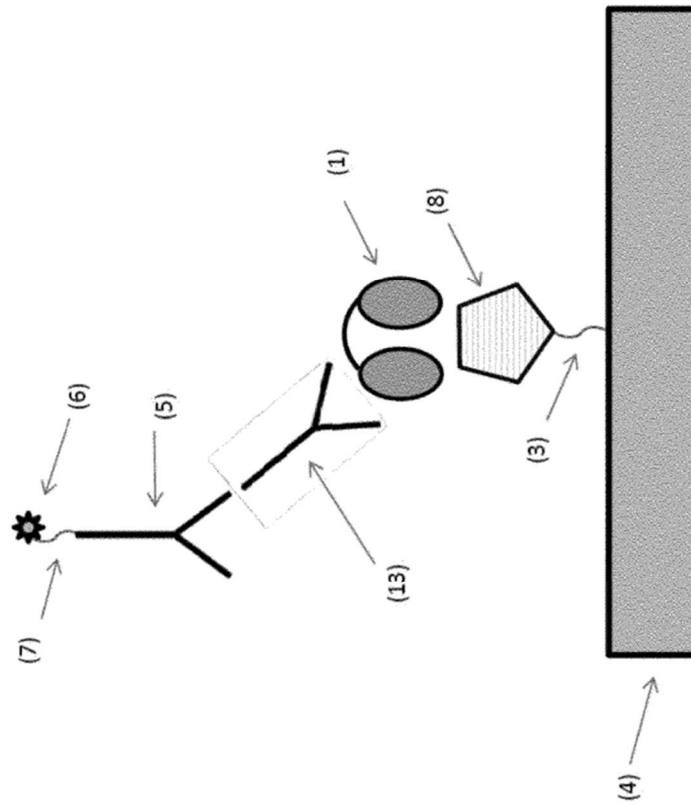


Figura 6

Figura 7

SEQ ID NO:	Secuencia
1	VTVSS
2	HHHHHHDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNYYAMGWF RQAPGKEREFAAITRSGVRSVSAIYGDSVKDRFTISRDNKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSQQGTLTV SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNYYAMGWFRQAPGKEREFA AITRSGVRSVSAIYGDSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSQQGTLTVTVSSGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQG TLTVSS
3	HHHHHHEVQLVESGGDLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTLTVSS
4	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLRSSQGTLTVSS
5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSGIKSSGDSTRYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKSRVSRTGLTYDNRGQGTLTVTVSSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNYYA MGWFRQAPGKEREFAAITRSGVRSVSAIYGDSVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSQQGT LTVSS

Figura 8

Captura	
Trayectoria del flujo	2
Caudal (µl/min)	5
Tiempo de contacto (s)	180
Concentración (µg/ml)	Elegida adecuadamente de un intervalo entre 1 y 100 µg/ml
Unión y disociación	
Trayectoria del flujo	1,2
Caudal (µl/min)	45
Tiempo de contacto de la muestra (s)	120
Concentración de la muestra (nM)	Variando de 0 a 6 micromolar
Tiempo de disociación (s)	1200
Regeneración 1	
Trayectoria del flujo	1,2
Caudal (µl/min)	10
Tiempo de contacto de regeneración (s)	180
Tampón de regeneración	HCl de glicina 10 mM pH 1,7
Tiempo de estabilización (s)	60
Si...Entonces...Otro	Si después de la regeneración 1 > 15 RU en Fc2
	Otro ciclo de salida
Regeneración 2	
Trayectoria del flujo	1,2
Caudal (µl/min)	10
Tiempo de contacto de regeneración (s)	240
Tampón de regeneración	HCl de glicina 10 mM pH 1,7