

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar transtiretina (TTR) mal plegada en una muestra biológica, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítoto dentro de los residuos 89-97 de TTR, en donde el anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat, CDR-H1 de SEQ ID NO: 75, CDR-H2 de SEQ ID NO: 76 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 77, y las tres CDRs de cadena ligera de Kabat, CDR-L1 de SEQ ID NO: 78, CDR-L2 de SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 80, y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítoto diferente de TTR en el que el anticuerpo reportero se selecciona del grupo que consiste en:

- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 5, CDR-H2 de SEQ ID NO: 7, CDR-H3 de SEQ ID NO: 9, CDR-L1 de SEQ ID NO: 11, CDR-L2 de SEQ ID NO: 13, y CDR-L3 de SEQ ID NO: 15 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;
- un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 59 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;
- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 60, CDR-H2 de SEQ ID NO: 61, CDR-H3 de SEQ ID NO: 62, CDR-L1 de SEQ ID NO: 63, CDR-L2 de SEQ ID NO: 64, y CDR-L3 de SEQ ID NO: 65 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;
- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 66, CDR-H2 de SEQ ID NO: 67, CDR-H3 de SEQ ID NO: 68, CDR-L1 de SEQ ID NO: 69, CDR-L2 de SEQ ID NO: 70, y CDR-L3 de SEQ ID NO: 71 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;

NO: 68, CDR-L1 de SEQ ID NO: 69, CDR-L2 de SEQ ID NO :70 y CDR-L3 de SEQ ID NO:71 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma; y
- un anticuerpo policlonal de prealbúmina policlonal anti-humana de conejo o un anticuerpo policlonal anti-TTR de conejo;

en donde si está presente TTR mal plegada en la muestra, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich, en donde la muestra biológica es de un paciente ATTR hereditario que porta una mutación TTR E89K o E89Q; y

- (b)** detectar el anticuerpo reportero que forma un complejo sándwich en la etapa (a), si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo de captura comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 103 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 104.
 3. El método de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo de captura comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 103 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 104 y el anticuerpo reportero es un anticuerpo policlonal de prealbúmina policlonal anti-humana de conejo un anticuerpo anti-TTR policlonal.
 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la TTR mal plegada incluye una sustitución E89K o una sustitución E89Q.
 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la muestra biológica es una primera alícuota de

una muestra recolectada y el método comprende además repetir la etapa (a) y (b) en una segunda alícuota de la muestra recolectada que además comprende un anticuerpo de ensayo y que compete con el anticuerpo de captura por la unión a TTR, en donde la detección de una cantidad reducida de anticuerpo reportero que está formando un complejo sándwich al repetir las etapas provee una indicación de la capacidad del anticuerpo de ensayo de unirse a TTR mal plegada.

6. El método de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo de ensayo es 14G8 (N° de depósito ATCC PTA124079) o una forma quimérica o humanizada del mismo, el anticuerpo de captura comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 103 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 104, y el anticuerpo reportero es una prealbúmina policlonal anti-humana de conejo o un anticuerpo anti TTR policlonal.
7. Un método para determinar una proporción del nivel de transtiretina (TTR) mal plegada multimérica total en relación con el nivel de TTR mal plegada total en una muestra biológica; comprendiendo el método:
 - (a) dividir una muestra biológica en dos porciones;
 - (b) detectar la TTR mal plegada total en una primera porción de la muestra biológica mediante
 - (i) poner en contacto la primera porción de la muestra biológica con un primer anticuerpo de captura, en donde el primer anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat, CDR-H1 de SEQ ID NO: 75, CDR-H2 de SEQ ID NO: 76 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 77, y

tres CDR de cadena ligera de Kabat, CDR-L1 de SEQ ID NO: 78, CDR-L2 de SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 80, que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 89-97 de TTR (residuos 89-97 de SEQ ID NO:26 TTR) y un primer anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítipo diferente de TTR de la del primer anticuerpo de captura, en el que el primer anticuerpo reportero se selecciona del grupo que consiste en:

- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 5, CDR-H2 de SEQ ID NO: 7, CDR-H3 de SEQ ID NO: 9, CDR-L1 de SEQ ID NO: 11, CDR-L2 de SEQ ID NO :13, y CDR-L3 de SEQ ID NO:15 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;
- un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 59 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;
- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 60, CDR-H2 de SEQ ID NO: 61, CDR-H3 de SEQ ID NO: 62, CDR-L1 de SEQ ID NO: 63, CDR-L2 de SEQ ID NO :64, y CDR-L3 de SEQ ID NO:65 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma;
- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 66, CDR-H2 de SEQ ID NO: 67, CDR-H3 de SEQ ID NO: 68, CDR-L1 de SEQ ID NO: 69, CDR-L2 de SEQ ID NO :70 y CDR-L3 de SEQ ID NO:71 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma; y

- un anticuerpo policlonal de prealbúmina policlonal anti-humana de conejo o un anticuerpo policlonal anti-TTR de conejo;

en donde si está presente TTR mal plegada en la muestra, el primer anticuerpo de captura y el primer anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich;
y

(c) (ii) detectar el anticuerpo reportero que forma un complejo sándwich en la etapa (b)(i), si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada; detectar la TTR mal plegada multimérica total en una segunda porción de la muestra biológica mediante

(i) poner en contacto la segunda porción de la muestra biológica con un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítotope dentro de los residuos 89-97 de TTR (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 26 TTR), en el que el segundo anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat, CDR-H1 SEQ ID NO: 75, CDR-H2 SEQ ID NO: 76 y CDR-H3 SEQ ID NO: 77, y tres CDR de cadena ligera de Kabat, CDR-L1 SEQ ID NO: 78, CDR-L2 SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 SEQ ID NO: 80, y un segundo anticuerpo reportero que se une específicamente dentro de los residuos 89-97 de TTR (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 26 TTR), en el que el segundo anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat, CDR-H1 SEQ ID NO: 75, CDR-H2 SEQ ID NO: 76 y CDR-H3 SEQ ID NO: 77, y CDR de cadena ligera CDR-L1 SEQ ID NO: 78, CDR-L2 SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 SEQ ID NO: 80; en donde si está

presente TTR mal plegada multimérica en la muestra, el segundo anticuerpo de captura y el segundo anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada multimérica formando un complejo sándwich; y

- (ii) detectar el segundo anticuerpo reportero que forma un complejo sándwich en la etapa (c)(i), si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada multimérica;
- (d) calcular una proporción del nivel de TTR mal plegada multimérica total de (c) en relación con el nivel de TTR mal plegada total de (b).

8. Un método para detectar transtiretina (TTR) mal plegada en una muestra biológica, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadenas pesadas de Kabat-Chothia Composite, CDR-H1 de SEQ ID NO: 5, CDR-H2 de SEQ ID NO: 7 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 9, y las tres CDRs de cadena ligera de Kabat-Chothia Composite CDR-L1 de SEQ ID NO: 11, CDR-L2 de SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 15, y se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítipo diferente de TTR en el que el anticuerpo reportero se selecciona del grupo que consiste en:
 - un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 103 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 104 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma,

- 14G8 (Nº de depósito ATCC PTA-124079) o una versión quimérica o humanizada del mismo,
- 5A1 (Nº de depósito ATCC PTA-124080) o una versión quimérica o versión humanizada del mismo,
- 6C1 (Nº de depósito ATCC PTA-124077) o una versión quimérica o versión humanizada del mismo,
- un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 59 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma,
- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 60, CDR-H2 de SEQ ID NO: 61, CDR-H3 de SEQ ID NO: 62, CDR-L1 de SEQ ID NO: 63, CDR-L2 de SEQ ID NO: 64, y CDR-L3 de SEQ ID NO: 65 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma,
- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 66, CDR-H2 de SEQ ID NO: 67, CDR-H3 de SEQ ID NO: 68, CDR-L1 de SEQ ID NO: 69, CDR-L2 de SEQ ID NO: 70 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 71 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma; y
- un anticuerpo policlonal de prealbúmina policlonal anti-humana de conejo o un anticuerpo policlonal anti-TTR de conejo;

en donde si está presente TTR mal plegada en la muestra, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich; y

- (b)** detectar el anticuerpo reportero que se une a la TTR mal plegada en la etapa (a), si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada.

9. El método de la reivindicación 8, en donde la muestra biológica es de un paciente con ATTR hereditaria.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la muestra biológica es de un paciente con ATTR hereditaria que presenta una mutación TTR seleccionada del grupo que consiste en V30M, Y114C, y S50I.
11. El método de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo de captura comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 81 y una región variable madura de cadena ligera de SEQ ID NO: 87.
12. El método de la reivindicación 11 en donde el anticuerpo de captura comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 81 y una región variable madura de cadena ligera de SEQ ID NO: 87 y el anticuerpo reportero es un anticuerpo policlonal de prealbúmina policlonal anti-humana de conejo o un anticuerpo anti-TTR policlonal.
13. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo reportero tiene una marca electroquimioluminiscente y es detectado por electroquimioluminiscencia.
14. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo de captura tiene una marca de biotina.
15. El método de cualquier reivindicación precedente, llevado a cabo cuantitativamente para indicar una cantidad absoluta o relativa de TTR mal plegada.

- 16.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo de captura está unido a una fase sólida antes de la etapa de contacto.
- 17.** El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo de captura está ligado a la fase sólida mediante un enlazador.
- 18.** El método de la reivindicación 16, en donde la fase sólida comprende al menos un electrodo.
- 19.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la muestra es una muestra de un ser humano.
- 20.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la muestra es plasma de un ser humano.
- 21.** Un método para determinar una proporción del nivel de transtiretina (TTR) mal plegada multimérica total en relación con el nivel de TTR mal plegada total en una muestra biológica; comprendiendo el método:
 - (a)** dividir una muestra biológica en dos porciones;
 - (b)** detectar la TTR mal plegada total en una primera porción de la muestra biológica mediante
 - (i)** poner en contacto la primera porción de la muestra biológica con un primer anticuerpo de captura, en el que el primer anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat/Chothia Composite, CDR-H1 de SEQ ID NO: 5, CDR-H2 de SEQ ID NO: 7 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 9, y tres CDR de cadena ligera de Kabat/Chothia Composite, CDR-L1 de SEQ ID NO: 11, CDR-L2 de SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 15, que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 101-109 (SEQ ID NO 30) de TTR y un primer

anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítoto diferente de TTR de

la del primer anticuerpo de captura, en el que el primer anticuerpo reportero se selecciona del grupo que consiste en:

- un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 103 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 104 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma,

- 14G8 (Nº de depósito ATCC PTA-124079) o una versión quimérica o humanizada del mismo,

- 5A1 (Nº de depósito ATCC PTA-124080) o una versión quimérica o versión humanizada del mismo,

- 6C1 (Nº de depósito ATCC PTA-124077) o una versión quimérica o versión humanizada del mismo,

- un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 59 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma,

- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 60, CDR-H2 de SEQ ID NO: 61, CDR-H3 de SEQ ID NO: 62, CDR-L1 de SEQ ID NO: 63, CDR-L2 de SEQ ID NO: 64, y CDR-L3 de SEQ ID NO: 65 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma,

- un anticuerpo que comprende CDR-H1 de SEQ ID NO: 66, CDR-H2 de SEQ ID NO: 67, CDR-H3 de SEQ ID NO: 68, CDR-L1 de SEQ ID NO: 69, CDR-L2 de SEQ ID NO: 70 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 71 o una versión quimérica o versión humanizada de la misma; y

- un anticuerpo policlonal de prealbúmina policlonal anti-humana de conejo o un anticuerpo policlonal anti-TTR de conejo;

en donde si está presente TTR mal plegada en la muestra, el primer anticuerpo de captura y el primer anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich; y

- (ii) detectar el primer anticuerpo reportero unido a la TTR mal plegada en la etapa (i), si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada;
- (c) detectar la TTR mal plegada multimérica total en una segunda porción de la muestra biológica mediante
 - (i) poner en contacto la segunda porción de la muestra biológica con un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítotope dentro de los residuos 101-109 (SEQ ID NO 30) en el que el segundo anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat/Chothia Composite, CDR-H1 de SEQ ID NO: 5, CDR-H2 de SEQ ID NO: 7 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 9, y tres Kabat/Chothia Composite CDR de cadena ligera, CDR-L1 de SEQ ID NO: 11, CDR-L2 de SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 15 y un segundo anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítotope dentro de los residuos 101-109 (SEQ ID NO 30) de TTR, en el que el segundo anticuerpo de captura comprende tres CDR de cadena pesada de Kabat/Chothia Composite CDR-H1 de SEQ ID NO: 5, CDR-H2 de SEQ ID NO: 7 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 9, y tres Kabat/Chothia Composite CDR de cadena ligera, CDR-L1 de SEQ ID NO: 11, CDR-L2 de SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 de SEQ ID NO: 15; en donde si está presente TTR mal plegada multimérica en la muestra, el segundo

anticuerpo de captura y el segundo anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada multimérica formando un complejo sándwich; y

- (d)** (ii) detectar el segundo anticuerpo reportero unido a la TTR mal plegada multimérica en la etapa (a), si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada multimérica; calcular una proporción del nivel de TTR mal plegada multimérica total de (c) en relación con el nivel de TTR mal plegada total de (b).