

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 603**

51 Int. Cl.:

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08862356 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2223118**

54 Título: **Ensayo de distinción**

30 Prioridad:

15.12.2007 EP 07024353

11.02.2008 EP 08002450

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

13.06.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR y
ZADAK, MARKUS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 407 603 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

Ensayo de distinción

- 5 La invención incluye un método para distinguir la presencia de anticuerpos antifármaco específicos y no específicos en una muestra, así como equipos para la utilización de tal método.

Antecedentes de la invención

- 10 Los inmunoensayos de fase sólida estándar con anticuerpos monoclonales incluyen la formación de un complejo entre el anticuerpo adsorbido en una fase sólida (anticuerpo de captura), el antígeno, y un anticuerpo contra otro epítipo del antígeno conjugado con un marcador detectable, por ejemplo una enzima (anticuerpo trazador). De ese modo se forma un sándwich: fase sólida-anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo trazador. En la reacción catalizada por el sándwich, la actividad de la enzima conjugada con el anticuerpo es proporcional a la concentración de antígeno en el medio de incubación. El método en sándwich estándar también se denomina inmunoensayo en puente de doble antígeno debido a que los anticuerpos de captura y trazador se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno. Hoesel, W., et al., J. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110, describen un ensayo en puente de doble antígeno anti-EPO en el que se utiliza una mezcla de rhEPO inmovilizada acoplada a grupos amino y a grupos carbohidrato. Los inmunoensayos tales como los ELISA en puente de doble antígeno son tipos de ensayo de utilización común en la investigación de una respuesta inmunogénica de un paciente hacia un fármaco de tipo anticuerpo. Mire-Sluis, A.R., et al., J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16, resumen las recomendaciones para el diseño y optimización de los inmunoensayos utilizando la detección de anticuerpos huésped frente a productos biotecnológicos. De acuerdo con Mire-Sluis et al., los formatos de ensayos con anticuerpos antifármaco conocidos muestran desventajas considerables. Los ensayos con anticuerpos antifármaco se citan, por ejemplo, en la patente WO 2005/045058 y la patente WO 90/006515. Los ensayos con anticuerpos antiidiotipo se citan, por ejemplo, en la patente US 5.219.730, las patentes WO 87/002778, PE 0 139 389, y PE 0 170 302. Wadhwa, M., et al., J. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17, describen estrategias para la detección, medición y caracterización de anticuerpos no deseados inducidos por agentes biológicos terapéuticos. Los principios de los diferentes inmunoensayos se describen, por ejemplo, en Hage, D.S., Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R. Lu, B., et al., Analyst. 121 (1996) 29R-32R, que describe la inmovilización orientada de anticuerpos para la utilización en inmunoensayos. Los inmunoensayos mediados por biotina-avidina se describen, por ejemplo, en Wilchek, M., y Bayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469. Se realizó una comparación del ELISA y la resonancia de plasmón superficial en Lofgren, J.A., et al., J. Immunol. 178 (2007) 7467-7472.
- 35 Lofgren, J.A., et al. describieron la comparación del ELISA y la resonancia de plasmón superficial para la evaluación de la inmunogenicidad clínica del panitumumab (J. Immunol. 178 (2007) 7467-7472). En la patente WO 2007/101661 se describe un ensayo con anticuerpos antifármaco.

Resumen de la invención

- 40 El primer aspecto de la presente invención es un método para determinar si un anticuerpo presente en una muestra es un anticuerpo antifármaco específico o un anticuerpo antifármaco no específico mediante la utilización de un inmunoensayo en puente de doble antígeno que incluye un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador, en el que dicho método incluye los siguientes pasos:

- 45 a) proporcionar
- 50 a-i) dicho anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,
- a-ii) dicho anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,
- 55 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con
- b-i) dicha muestra,
- b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,
- 60 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,
- b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,
- b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,

5 c) determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco no específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

10 El aspecto de la presente invención es un método para distinguir, en una muestra, un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio humanizado de un anticuerpo anti IgG humano con un inmunoensayo, en el que el método incluye los siguientes pasos:

15 a) proporcionar

a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

20 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,

25 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,

b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,

30 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,

c) determinar un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio humanizado mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

35 Aún otro aspecto de la presente invención es un método para determinar con un inmunoensayo si un anticuerpo antifármaco en una muestra está en forma monomérica o oligomérica, en el que el método incluye los siguientes pasos:

40 a) proporcionar

a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

45 a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

50 b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,

55 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,

b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,

b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,

60 c) determinar que el anticuerpo antifármaco en la muestra está en forma monomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y

α) un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o

65 β) un inmunoensayo negativo en b-ii), b-iii), b-iv), y b-v),

o
determinar que un anticuerpo antifármaco en la muestra está en forma oligomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i), y

- 5 α) un inmunoensayo negativo en b-iii), o
 β) un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v),

en el que todos los otros inmunoensayos no enumerados son positivos.

10

En una realización, la clase de anticuerpos antifármaco se determina de acuerdo con la tabla siguiente:

	Anticuerpo farmacológico específico, respuesta monomérica	Anticuerpo farmacológico específico, respuesta oligomérica	Anticuerpo farmacológico no específico, respuesta oligomérica	Anticuerpo farmacológico no específico, respuesta monomérica	Anticuerpo farmacológico, respuesta inespecífica
Muestra no enriquecida b-i)	+	+	+	+	+
b-ii)	-	+	+	-	+
b-iii)	-	-	-	-	+
b-iv)	+	+	+	-	+
b-v)	+	+	-	-	+

15

En una realización de los aspectos de la invención, dicho inmunoensayo es un inmunoensayo en puente de doble antígeno que incluye un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador. Otra realización de los aspectos de la invención es que dicho anticuerpo farmacológico es un anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En una realización dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo para el tratamiento de la artritis reumatoide o la artrosis. En otra realización, dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo frente el receptor de IL-6, o frente al receptor de IGF-1, o el receptor de IL-13 1 alfa. Una realización de los aspectos de la presente invención contempla que dicho anticuerpo farmacológico de captura es una mezcla de dicho anticuerpo farmacológico que incluye, al menos, dos de tales anticuerpos farmacológicos que difieren en el sitio del anticuerpo que se conjuga con la fase sólida, y el anticuerpo farmacológico trazador es una mezcla de dicho anticuerpo farmacológico que incluye, al menos, dos de dichos anticuerpos farmacológicos, que difieren en el sitio del anticuerpo que se conjuga con el marcador detectable. Otra realización es que la conjugación del anticuerpo farmacológico con su compañero de conjugación se lleva a cabo a través de una unión química mediante los grupos N-terminal y/o grupos ε-amino (lisina), grupos ε-amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólicos del esqueleto de aminoácidos del anticuerpo farmacológico y/o grupos alcohol de azúcares de la estructura de carbohidratos del anticuerpo farmacológico. En una realización de los aspectos de la invención, la mezcla del anticuerpo farmacológico de captura o la mezcla del anticuerpo farmacológico trazador incluye un anticuerpo farmacológico conjugado mediante un grupo amino y un anticuerpo farmacológico conjugado mediante una estructura glucídica a su compañero de conjugación. En una realización adicional, la conjugación del anticuerpo farmacológico de captura con la fase sólida se lleva a cabo mediante adsorción pasiva, o mediante un par de unión específico. En una realización de la invención, el par de unión específico (primer componente/ segundo componente) se selecciona entre estreptavidina o avidina/ biotina, o anticuerpo/ antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), o lectina/ polisacárido, o esteroide/ proteína de unión al esteroide, u hormona/ receptor hormonal, o enzima/ sustrato, o IgG/ proteína A y/ o G. En una realización, el anticuerpo farmacológico de captura se conjuga con la biotina y la conjugación a la fase sólida se lleva a cabo mediante la avidina o estreptavidina inmovilizada. En una realización de los aspectos de la presente invención, tras el paso b), el método incluye un paso adicional ba) de puesta en contacto de dicho anticuerpo farmacológico de captura contactado con dicha muestra en el paso b) con dicho anticuerpo farmacológico trazador y la detección del marcador detectable. En aún otra realización de los aspectos de la invención, el anticuerpo farmacológico trazador se conjuga con el marcador detectable mediante un par de unión específico. En una realización, dicho anticuerpo farmacológico trazador se conjuga con digoxigenina y el enlace con el marcador detectable se lleva a cabo mediante un anticuerpo frente a la digoxigenina. Otra realización de los aspectos de la presente invención es aquella en la que la proporción del anticuerpo farmacológico de captura respecto al anticuerpo farmacológico trazador es de entre 1:10 y 50:1 (proporción hace referencia a la proporción de moléculas de anticuerpo, independientemente del peso molecular de los conjugados, que puede ser diferente).

45

Otro aspecto de la presente invención es un equipo para determinar un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico en una muestra, que incluye:

- 5 a) una placa microtitulada recubierta con estreptavidina,
- b) un reactivo para la conjugación de un anticuerpo farmacológico con la biotina,
- c) un reactivo para la conjugación de dicho anticuerpo farmacológico con la digoxigenina,
- 10 d) un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano,
- e) un reactivo para la oligomerización de dicho anticuerpo farmacológico,
- 15 f) inmunoglobulina G humana en forma monomérica, y
- g) inmunoglobulina G humana en forma oligomérica.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para determinar el tipo de anticuerpo frente a un anticuerpo farmacológico (anticuerpos antifármaco) presente en una muestra mediante la utilización de un inmunoensayo en puente de doble antígeno que incluye un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador, en el que el método incluye los siguientes pasos:

- a) proporcionar
 - 25 a-i) dicho anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,
 - a-ii) dicho anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,
 - 30 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con
 - b-i) dicha muestra,
 - 35 b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,
 - b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,
 - b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,
 - 40 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,
 - 45 c) determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco monomérico específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o
 - determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco oligomérico específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-iii), o
 - 50 determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano no específico oligomérico mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-ii) y b-iv) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v), o
 - 55 determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo inespecífico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii), b-iii), b-iv) y b-v), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano no específico monomérico mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii), b-iii), b-iv) y b-v).

60 Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo farmacológico", de acuerdo con la invención, hace referencia a un anticuerpo que puede administrarse a un individuo, de manera que se sospecha que una muestra de dicho individuo contiene dicho anticuerpo farmacológico tras su administración. En un ensayo realizado de acuerdo con la invención, el anticuerpo farmacológico, el anticuerpo farmacológico de captura y el anticuerpo farmacológico trazador incluyen la "misma" molécula de anticuerpo, por ejemplo, producida de manera recombinante con el mismo vector de expresión y que

incluye la misma secuencia de aminoácidos. Los anticuerpos farmacológicos (anticuerpos monoclonales terapéuticos) se utilizan ampliamente en el tratamiento de varias enfermedades, tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo malignidades hematológicas y sólidas, incluyendo el linfoma no Hodgkin, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal) o enfermedades inflamatorias. Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en Levene, A.P., et al., *Journal of the Royal Society of Medicine* 98 (2005) 145-152; Groner, B., et al., *Curr. Mol. Meth.* 4 (2004) 539-547; y en Harris, M., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292-302. Algunos anticuerpos ejemplares son, por ejemplo, los anticuerpos frente a CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, el antígeno Levis Y, el receptor de IL-6, el receptor de IGF-1, o el receptor de IL-13 1 alfa. En una realización, dicho anticuerpo farmacológico es un anticuerpo útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, es decir, un anticuerpo antiinflamatorio, tal como un anticuerpo antirreceptor de IL-6, un anticuerpo antirreceptor de IGF-1 o un anticuerpo antirreceptor de IL-13 1 alfa.

Un ejemplo (preferiblemente monoclonal) de anticuerpo es un anticuerpo frente al receptor de IL-6 (mAb IL-6R). Dicho anticuerpo se describe, por ejemplo, en Mihara, et al., *Clin. Immunol.* 98 (2001) 319-326; Nishimoto, N., et al., *Blood* 106 (2005) 2627-2632, en el ensayo clínico NCT00046774 o en la patente WO 2004/096274.

Un ejemplo (preferiblemente monoclonal) de anticuerpo es un anticuerpo frente al receptor de IGF-1 (mAb IGF-1R). Dicho anticuerpo se describe, por ejemplo, en la patente WO 2004/087756 o en la patente WO 2005/005635.

Un ejemplo (preferiblemente monoclonal) de anticuerpo es un anticuerpo frente al receptor de IL-13 alfa (también descrito como mAb IL-13Ra1 o mAb IL-13R a partir de ahora). Los anticuerpos frente al IL-13Ra1 se conocen a partir de, por ejemplo, la patente WO 96/29417, la patente WO 97/15663, la patente WO 03/080675, Graber, P., et al., *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 4286-4298; Poudrier, J., et al., *J. Immunol.* 163 (1999) 1153-1161; Poudrier, J., et al., *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 3157-3164; Aikawa, M., et al., *Cytokina* 13 (2001) 75-84, y están disponibles comercialmente, por ejemplo, por R&D Systems Inc. EE.UU. Otros ejemplos de anticuerpo frente al IL-13Ra1 se describen en la patente WO 2006/072564.

El término "anticuerpo antifármaco", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a un anticuerpo dirigido frente, es decir, que se une a un región antigénica de un anticuerpo farmacológico. Esta región antigénica puede ser la región variable, una CDR, la región constante, o la glicestructura del anticuerpo farmacológico. En una realización dicho anticuerpo antifármaco se dirige frente a una región CDR de dicho anticuerpo farmacológico o una modificación secundaria de dicho anticuerpo farmacológico, que resulta de la producción recombinante de dicho anticuerpo farmacológico en células no humanas, tales como células CHO, células HEK, células Sp2/0 o células BHK. Generalmente, los anticuerpos antifármaco se dirigen frente a una región antigénica de un anticuerpo farmacológico reconocida por el sistema inmunitario de un animal al que se ha administrado el anticuerpo farmacológico. Los anticuerpos descritos anteriormente se denominan "anticuerpos antifármaco específicos". Los anticuerpos farmacológicos están diseñados para incluir el menor número de regiones antigénicas posible. Por ejemplo, los anticuerpos farmacológicos diseñados para la utilización en humanos se humanizan con anterioridad a su administración a un paciente humano para minimizar la generación de una respuesta inmunitaria frente al anticuerpo farmacológico. Esta respuesta inmunitaria sería en forma de anticuerpos antifármaco dirigidos contra las partes no humanas de tales anticuerpos farmacológicos humanizados, tal como por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad en los dominios variables (véase, por ejemplo, Pan, Y., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 43-49).

El término "anticuerpo anti IgG humano" hace referencia a un anticuerpo humano dirigido frente a cualquier región antigénica de un anticuerpo humano o humanizado del anticuerpo de clase G. Tal anticuerpo anti IgG humano es un ejemplo de un "anticuerpo antifármaco no específico". En esta solicitud, el término "anticuerpo antifármaco no específico" hace referencia a un anticuerpo que se une al anticuerpo farmacológico pero que también se une a muchos otros anticuerpos, tales como anticuerpos humanos endógenos, debido a la unión a un lugar antigénico común que no determina la especificidad farmacológica del anticuerpo.

Los anticuerpos contienen como las proteínas varias porciones reactivas, tales como, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteína, y metionina), grupos ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutámico) y grupos alcohol de azúcares. Estos, pueden utilizarse para que se unan a un compañero de unión como una superficie, una proteína, un polímero, (tal como por ejemplo PEG, celulosa o poliestirol), una enzima, o un miembro de un par de unión (véase, por ejemplo Aslam M., y Dent, A., *Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd.* (1999) 50-100).

Uno de los grupos de reactivos más comunes es la ϵ -amina alifática del aminoácido lisina. En general, aproximadamente todos los anticuerpos contienen lisina en abundancia. Las aminas de la lisina son nucleófilos razonablemente buenos por encima de un pH de 8,0 ($pK_a = 9,18$) y, por consiguiente, reaccionan con facilidad y de manera limpia con varios reactivos para formar enlaces estables. Otro grupo reactivo común en los anticuerpos es el residuo de tiol del aminoácido cistina (que contiene azufre) y su producto de reducción, la cisteína (o media cistina). La cisteína contiene un grupo tiol libre, que es más nucleofílico que las aminas y es generalmente el grupo funcional más reactivo en una proteína. Generalmente, los tioles son reactivos a un pH neutro, y consecuentemente pueden

enlazarse con otras moléculas, selectivamente en la presencia de aminas. Dado que los grupos sulfhidrilo libres son relativamente reactivos, a menudo las proteínas con estos grupos los presentan en su forma oxidada, tal como grupos disulfuro o uniones disulfuro. Además de la cistina y la cisteína, algunas proteínas también tienen el aminoácido metionina, que contiene azufre en un enlace tioéter. La literatura describe la utilización de varios reactivos de enlace cruzado tiolizantes, tales como el reactivo de Traut (2-iminotiolano), el succinimidilo (acetiltio) acetato (SATA), o hexanoato de sulfosuccinimidilo 6-[3-(2-piridilditio)propionamido] (Sulfo-LC-SPDP) para proporcionar vías eficientes de introducción de múltiples grupos sulfhidrilo mediante grupos amino reactivos. Los ésteres reactivos, en particular los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), están entre los reactivos habitualmente más utilizados para la modificación de grupos amina. El pH óptimo para la reacción en un ambiente acuoso es de entre un pH de 8,0 y 9,0. Los isotiocianatos son reactivos de modificación de aminas y forman enlaces tiourea con las proteínas. Estos reaccionan con las aminas de las proteínas en solución acuosa (de manera óptima a pH de entre 9,0 y 9,5). Los aldehídos reaccionan bajo condiciones acuosas moderadas con aminas alifáticas y aromáticas, hidracinas, e hidracidas para formar una imina intermedia (base de Schiff). Un base de Schiff puede reducirse selectivamente con agentes reductores fuertes o suaves (tales como el borohidruro de sodio o el cianoborohidruro de sodio) para derivar un enlace alquilo estable. Otros reactivos que pueden utilizarse para modificar las aminas son los anhídruros ácidos. Por ejemplo, el anhídruro de dietilentriaminopentaacético (DTPA) es un agente quelante bifuncional que incluye dos grupos amina reactivos. Éste puede reaccionar con grupos N-terminal y grupos ε-amina de proteínas para formar enlaces amida. Los anillos anhídruro se abren para crear brazos multivalentes y quelantes de metales, capaces de unirse fuertemente con metales en un complejo de coordinación.

Otro grupo reactivo común en los anticuerpos es el grupo ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutámico). Las proteínas contienen grupos ácido carboxílico en la posición C-terminal y en las cadenas laterales del ácido aspártico y del ácido glutámico. Para la conjugación, el grupo ácido carboxílico habitualmente se convierte en un éster reactivo mediante la utilización de una carboimida hidrosoluble y reacciona con un reactivo nucleofílico, tal como una amina, una hidracida o una hidracina. El reactivo que contiene la amina debería ser ligeramente básico para reaccionar selectivamente con el ácido carboxílico en presencia de otras aminas en la proteína. El enlace entrecruzado de la proteína puede ocurrir cuando el pH se aumenta por encima de 8,0.

El peryodato de sodio puede utilizarse para oxidar la porción alcohol de un azúcar en la porción glucídica de un aldehído. Cada grupo aldehído puede reaccionar con una amina, hidracida o hidracina tal y como se describe para los ácidos carboxílicos. Debido a que la porción glucídica se encuentra predominantemente en el región del fragmento cristalizable (Fc) de un anticuerpo, la conjugación puede lograrse mediante una modificación dirigida del carbohidrato lejana al sitio de unión al antígeno.

Los reactivos que reaccionan con el tiol son aquellos que se unen a grupos tiol en proteínas, formando productos enlazados a tioéter. Estos reactivos reaccionan rápidamente a un pH entre neutro y ligeramente ácido y, por consiguiente pueden reaccionar selectivamente en presencia de grupos amina. Los derivados haloacetilo, por ejemplo, las yodoacetamidas, forman enlaces tioéter y son reactivos para la modificación del tiol. En los anticuerpos, la reacción tiene lugar en los grupos cisteína, que están intrínsecamente presentes o resultan de la reducción de los disulfuros de la cistina en varias posiciones del anticuerpo. Otros reactivos útiles son las maleimidas. La reacción de las maleimidas con los reactivos que reaccionan con el tiol es esencialmente la misma que con las yodoacetamidas. Las maleimidas reaccionan rápidamente a un pH entre neutro y ligeramente ácido.

Las aminas, las hidracidas y las hidracinas son reactivos que reaccionan con aldehídos y con el ácido carboxílico (formación de enlaces amida, hidrazona o alquilamina). Las aminas, las hidracidas y las hidracinas pueden unirse a los ácidos carboxílicos de las proteínas tras la activación del grupo carboxilo mediante una carbodiimida hidrosoluble. Los reactivos que contienen amina deben ser ligeramente básicos para que reaccionen selectivamente con la proteína activada con carbodiimida en presencia de las ε-aminas más básicas de la lisina para formar enlaces amida estables. En la reacción con los grupos aldehído, que pueden generarse en los anticuerpos mediante la oxidación del peryodato de los residuos glucídicos en el anticuerpo, se forma un intermediario de la base de Schiff que puede reducirse hasta una alquilamina mediante la reducción del intermediario con los agentes reductores hidrosolubles cianoborohidruro de sodio (moderado y selectivo) o borohidruro de sodio (fuerte).

El término "muestra", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia derivada de un ser vivo o un ser anteriormente vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre total, suero o plasma de un individuo, que son las fuentes de muestras más ampliamente utilizadas en la rutina clínica.

El término "fase sólida", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a una sustancia no fluida e incluye partículas (incluyendo micropartículas y cuentas) hechas a partir de materiales tales como un polímero, metal (partículas paramagnéticas o ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias en gel, tales como sílice, aluminio y polímeros de gel; capilares, que pueden estar hechos de polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas microtituladas; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros contenedores de muestras de espectrómetro. Un componente de fase sólida de un ensayo se distingue de las superficies sólidas

inertes con las que el ensayo puede estar en contacto debido a que la "fase sólida" contiene, al menos, una porción en su superficie, la cual se pretende que interaccione con el anticuerpo farmacológico de captura. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, una tira, una cubeta o una placa microtitulada, o puede ser un componente no estacionario, tal como las cuentas y las micropartículas. Las micropartículas también pueden utilizarse como fase sólida para los formatos de ensayo homogéneos. Pueden utilizarse varias micropartículas que permiten el enlace tanto no covalente como covalente a proteínas y otras sustancias. Tales partículas incluyen partículas de polímero, tales como poliestireno y poli(metilmacrilato); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas de cerámica, tales como partículas de sílice, vidrio y óxido de metal. Véase, por ejemplo, Martin, C.R., et al., *Analytical Chemistry-News & Features* (1998) 322A-327A, que se incorpora aquí como referencia. Los soportes sólidos para los inmunoensayos de acuerdo con la invención se describen ampliamente en el estado de la materia (véase, por ejemplo, Butler, J.E., *Methods* 22 (2000) 4-23).

Los cromógenos (grupos y colorantes fluorescentes o luminiscentes), las enzimas, los grupos NMR activos o las partículas de metal, los haptenos, por ejemplo la digoxigenina, son ejemplos de marcadores detectables. El marcador detectable también puede ser un grupo de entrecruzamiento fotoactivable, por ejemplo un grupo azido o acirina. Los quelatos de metal que pueden detectarse mediante electroquimioluminiscencia también son grupos detectables emisores de señal, y se le da una preferencia particular a los quelatos de rutenio, por ejemplo al quelato de rutenio (bispiridilo)³²⁺. Los grupos marcadores de rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en la patente PE 0 580 979, la patente WO 90/005301, la patente WO 90/11511 y la patente WO 92/14138.

Las muestras en las que se debe determinar un anticuerpo a menudo contienen otras sustancias aparte del anticuerpo en cuestión. Así, no puede evitarse que la determinación mediante un inmunoensayo de como resultado un inmunoensayo positivo aunque la muestra no contenga dicho anticuerpo que se debe determinar. Para poder utilizar dicho ensayo, tales inmunoensayos positivos deben excluirse o, al menos, reducirse a una proporción aceptable, por ejemplo, por debajo del 5 % de todos los inmunoensayos positivos.

Sorprendentemente, se ha observado que se pueden identificar los inmunoensayos positivos de una muestra que debe analizarse mediante un método para determinar un anticuerpo frente a un anticuerpo farmacológico (anticuerpos antifármaco, ADA) a través del enriquecimiento de la muestra que debe analizarse con el anticuerpo farmacológico y con el anticuerpo inespecífico mediante la determinación del resultado del método con estas muestras enriquecidas.

El término "enriquecido(a)", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a que a la muestra que se debe analizar se le ha añadido una sustancia suplementaria, que puede estar o no estar ya presente en dicha muestra. La suplementación de la sustancia tiene el efecto de que dicha sustancia está presente en dicha muestra en una concentración que excede la concentración del anticuerpo antifármaco en cuestión en dicha muestra. En una realización, dicha sustancia suplementaria es un anticuerpo, en otra realización es dicho anticuerpo farmacológico o un anticuerpo específico frente a la parte Fc, tal como un anticuerpo anti IgG humano.

El término "anticuerpo", tal y como se utiliza aquí, abarca las diferentes formas de estructura del anticuerpo, que incluyen anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo farmacológico en el método de acuerdo con la invención es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo agotado con antígenos de célula T (véase, por ejemplo, la patente WO 98/33523, la patente WO 98/52976, o la patente WO 00/34317). La ingeniería genética de anticuerpos se describe, por ejemplo, en Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81 (1984) 6851-6855; la patente US 5.202.238 y la patente US 5.204.244; Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1117-1125.

Un "fragmento de anticuerpo" hace referencia a un fragmento de un anticuerpo completo que mantiene la capacidad de unirse al mismo antígeno que el anticuerpo completo. Un "anticuerpo completo" es un anticuerpo que incluye dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas, cada una de las cuales incluye una región variable y una región constante. Un "conjugado de un anticuerpo" hace referencia a un conjugado de un anticuerpo con un polipéptido adicional. La unión del antígeno no se disminuye por la conjugación al polipéptido posterior. Los "fragmentos de anticuerpo" incluyen una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente los dominios variables del mismo o al menos la porción de unión al antígeno del mismo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo son moléculas de anticuerpo monocatenarias (scFv), fragmentos Fab y F(ab)₂, y similares, siempre que mantengan las características de unión del anticuerpo. Los anticuerpos ScFv se describen, por ejemplo, en Huston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Huston también describe enlazantes y métodos para la unión de polipéptidos útiles para la presente invención.

La "parte Fc" de un anticuerpo no se incluye directamente en la unión al antígeno, pero presenta varias funciones efectoras. En relación a la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), es decir IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; o IgA en IgA1 e IgA2. De acuerdo con la clase de inmunoglobulina a la que pertenece un anticuerpo, las regiones constantes de la cadena

pesada de las inmunoglobulinas se denominan α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), y μ (IgM), respectivamente. El anticuerpo farmacológico en los métodos de acuerdo con la invención pertenece, en una realización, a la clase IgG. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido para los expertos en la materia y definido en base a la escisión con papaína del anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una proteína que incluye uno o más polipéptidos esencialmente codificados por los genes de los anticuerpos. Los diferentes polipéptidos por los que está compuesto un anticuerpo se denominan en relación a su peso como cadenas polipeptídicas ligeras y cadenas polipeptídicas pesadas. Los genes de anticuerpo reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes diferentes, así como la gran variedad de genes de las regiones variables de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden existir en multitud de formatos, incluyendo, por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras individuales, Fv, Fab, y F(ab)₂, así como cadenas individuales (scFv) (por ejemplo Huston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood, L., et al., Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición (1984); Hunkapiller, T., y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16).

En general, un anticuerpo incluye dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada cadena polipeptídica ligera y pesada contiene una región variable (la porción amino terminal de la cadena polipeptídica) que contiene un dominio de unión que es capaz de interactuar con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas incluye una región constante (la porción carboxi terminal de la cadena polipeptídica). La región constante de la cadena pesada media la unión del anticuerpo i) a las células que presentan un receptor de Fc gamma (Fc γ R), tales como las células fagocíticas, o ii) a las células que presentan el receptor neonatal de Fc (FcRn), también conocido como receptor de Brambell. El dominio variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo, a su vez, incluye diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos que incluyen secuencias parciales derivadas de un anticuerpo no humano y de un anticuerpo humano. Mayoritariamente, los anticuerpos humanizados derivan de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor), en el que se reemplazan los residuos de una región hipervariable por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tiene la especificidad y la afinidad deseadas (véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 81 (1984) 6851-6855; la patente US 5.202.238; la patente US 5.204.244). En algunos ejemplo, los residuos de la región marco (FR) del anticuerpo humano se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir modificaciones adicionales, por ejemplo residuos de aminoácido que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Tales modificaciones dan como resultado variantes de tales anticuerpos receptores o donadores, que son homólogos pero no idénticos a la secuencia parental correspondiente. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado incluirá esencialmente todos los dominios variables, al menos uno y habitualmente dos, en los que todos, o esencialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de un anticuerpo donador no humano, y todas o esencialmente todas las FR son las de un anticuerpo receptor humano. De manera opcional, el anticuerpo humanizado también incluirá, al menos, una porción de una región constante de un anticuerpo, y habitualmente la de un anticuerpo humano. Los métodos para humanizar los anticuerpos no humanos se han descrito en la materia. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos a partir de una fuente no humana. Se hace referencia a estos residuos de aminoácido no humanos como residuos "importados", que habitualmente se captan de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores mediante la sustitución de las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo no humano. De acuerdo con esto, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos, en los que esencialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, habitualmente los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de la región hipervariable y, posiblemente algunos residuos de la región marco, por los residuos de los sitios análogos de los anticuerpos de roedores o primates no humanos.

El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que incluye la población son idénticos excepto por las mutaciones naturales posibles que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos frente a un único lugar antigénico. Además, en oposición a las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes sitios antigénicos (determinantes o epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único sitio antigénico en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos debido a que pueden sintetizarse sin contaminarse con otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que se obtiene de una población esencialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se requiere una producción del anticuerpo mediante un método particular.

El término "anticuerpo en forma monomérica", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a que dicho anticuerpo no se asocia de forma covalente o no covalente con moléculas de anticuerpo adicionales con la misma especificidad. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-1R está en forma monomérica si no se asocia a un segundo anticuerpo anti-IGF-1R. Esto no excluye que dicho anticuerpo pueda asociarse de forma covalente o no covalente a otros anticuerpos tales como, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6R.

El término "anticuerpo en forma oligomérica", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a que dicho anticuerpo se asocia de forma covalente o no covalente a otras moléculas de anticuerpo con la misma especificidad. En una realización, el "anticuerpo en forma oligomérica" se asocia de forma covalente a una o más moléculas adicionales de anticuerpo con la misma especificidad. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-1R está en forma oligomérica si se asocia con, al menos, un segundo anticuerpo anti-IGF-1R.

El término "misma especificidad", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a que dos anticuerpos se unen a la misma molécula diana, es decir, al mismo antígeno. Esto no excluye que los dos anticuerpos se unan a diferentes epítomos de dicho antígeno. En una realización, los anticuerpos incluidos en un anticuerpo en forma oligomérica se unen al mismo antígeno y al mismo epítomo. En otra realización, dichos anticuerpos en un anticuerpo en forma oligomérica son los mismos anticuerpos monoclonales. Este método es especialmente útil si la muestra contiene anticuerpos distintos a los anticuerpos antifármaco en cuestión, que pueden interferir en los inmunoensayos para la detección de dichos anticuerpos antifármaco y, por consiguiente, dan como resultado un inmunoensayo positivo. En una realización, los métodos de la presente invención son útiles para la determinación de anticuerpos antifármaco frente a los anticuerpos farmacológicos utilizados en la terapia antiinflamatoria. El término "anticuerpos farmacológicos utilizados en la terapia antiinflamatoria", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a que dichos anticuerpos farmacológicos se dirigen frente a un receptor de superficie celular que media la inflamación. Tales receptores son, por ejemplo, el receptor de IL-6, o el receptor de IGF-1, o el receptor 1 de IL-13a. Si se analiza una muestra de un sujeto tratado con un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio, debe determinarse si el resultado positivo del método se basa en un anticuerpo antifármaco o en un anticuerpo diferente a los anticuerpos antifármaco de la muestra. Un ejemplo de tal caso es una muestra de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune, tal como el reumatismo, y por consiguiente, una muestra obtenida de tal sujeto contiene los denominados "factores reumatoides". El término "factores reumatoides", tal y como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a anticuerpos que se unen a la IgG humana, en concreto a la parte Fc de la IgG humana. En la mayoría de casos, estos "factores reumatoides" son moléculas de unión oligoméricas.

De este modo, se ha observado que, sorprendentemente, la interferencia de tales anticuerpos anti IgG humanos puede determinarse mediante el enriquecimiento de la muestra que debe analizarse con los anticuerpos definidos, ya sea en forma monomérica u oligomérica, y mediante la realización del método para determinar un anticuerpo antifármaco con tal muestra enriquecida y en base a los resultados del método realizado con las diferentes muestras, determinando si el inmunoensayo es positivo o no.

Un aspecto de la presente invención es un método para determinar si un anticuerpo presente en una muestra es un anticuerpo antifármaco o un anticuerpo anti IgG humano, es decir, si un anticuerpo presente en la muestra es un anticuerpo antifármaco específico o un anticuerpo antifármaco no específico, mediante la utilización de un inmunoensayo en puente de doble antígeno que incluye un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador, en el que dicho método incluye los siguientes pasos:

a) proporcionar

a-i) dicho anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

a-ii) dicho anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,

b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,

b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido IgG humana en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,

b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido IgG humana en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,

- 5 c) determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

10 Los términos "inmunoensayo positivo" y "resultado del inmunoensayo positivo", que se utilizan indistintamente en esta solicitud, hacen referencia a que, en los casos en que el inmunoensayo se realiza con dicha muestra no suplementada, el inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementada produce una señal por encima del nivel basal de dicho inmunoensayo. En una realización, dicho nivel basal es la señal media obtenida mediante la determinación de varias muestras de diferentes individuos, a los que no se ha administrado dicho anticuerpo farmacológico, en dicho inmunoensayo más tres veces la desviación estándar del valor medio, es decir, un intervalo de confianza del 95 %. Del mismo modo, los términos "inmunoensayo negativo" y "resultado del inmunoensayo negativo", que se utilizan indistintamente en esta solicitud, hacen referencia a una señal correspondiente a los niveles basales de dicho inmunoensayo, es decir, dentro de las tres desviaciones estándar de la señal obtenida con una muestra sin el anticuerpo en dicho inmunoensayo.

20 Los términos "inmunoensayo positivo" y "resultado del inmunoensayo positivo", que se utilizan indistintamente en esta solicitud, hacen referencia a que, en los casos en que el inmunoensayo se realiza con dicha muestra suplementada, el inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada produce, en una realización, una señal relativa del 50% o superior, en otra realización del 65 % o superior, aún en otra realización del 80 % o superior, de dicha señal obtenida en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementada. El término "inmunoensayo negativo" hace referencia, en caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada, tal y como se utiliza en esta solicitud, a que el inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada produce, en una realización, una señal relativa menor al 50% de dicha señal, en otra realización menor al 65 % de dicha señal, aún en otra realización menor al 80 % de dicha señal, en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementada.

30 El inmunoensayo de acuerdo con la invención incluye los siguientes pasos en el siguiente orden:

- 35 a) poner en contacto el anticuerpo farmacológico de captura conjugado con una fase sólida con dicha muestra enriquecida o no,
- b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura conjugado con una fase sólida, que se ha puesto en contacto con la muestra, con el anticuerpo farmacológico trazador,
- 40 c) detectar el anticuerpo farmacológico trazador mediante la detección del marcador detectable conjugado con el anticuerpo farmacológico trazador.

De manera opcional, pueden incluirse pasos de lavado entre los pasos a) y b), y b) y c).

45 Un "inmunoensayo positivo" y un "resultado del inmunoensayo positivo" se obtiene cuando

- a) un anticuerpo antifármaco contenido en la muestra se une a la fase sólida mediante el anticuerpo farmacológico de captura,
- 50 b) el anticuerpo farmacológico trazador se une al complejo de a), y
- c) el marcador detectable del anticuerpo farmacológico trazador se detecta directamente o con la ayuda de un compañero de unión adicional.

55 En el caso de un "inmunoensayo negativo" o un "resultado del inmunoensayo negativo", uno o más de los criterios anteriores no se cumple.

60 El aspecto de la presente invención es un método para distinguir en una muestra un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio humanizado de un anticuerpo anti IgG humano, es decir, distinguir entre un anticuerpo antifármaco específico y un anticuerpo antifármaco no específico, en el que el método incluye los siguientes pasos:

- a) proporcionar
- 65 a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

5 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

b-i) dicha muestra,

10 b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,

b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,

15 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,

20 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,

c) determinar un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio humanizado mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

25 Aún, un aspecto adicional de la presente invención es un método para determinar si un anticuerpo antifármaco en una muestra está en forma monomérica o en forma oligomérica, en el que el método incluye los siguientes pasos:

30 a) proporcionar

a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

35 a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

40 b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,

45 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,

b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,

50 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,

55 c) determinar que el anticuerpo antifármaco en la muestra está en forma monomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

Sorprendentemente se ha observado que con la suplementación de dicha muestra con dicho anticuerpo farmacológico en forma monomérica y en forma oligomérica, así como con IgG humana en forma monomérica y en forma oligomérica, se puede obtener un patrón de resultados de ensayo a partir del cual se puede realizar la determinación de la clase del resultado, lo que se describe en el siguiente esquema:

60

	Respuesta monomérica específica	Respuesta oligomérica específica	Respuesta oligomérica no específica	Respuesta monomérica no específica
Muestra, b-i)	+	+	+	+
b-ii)	-	+	+	-
b-iii)	-	-	-	-
b-iv)	+	+	+	-
b-v)	+	+	-	-

5 Por consiguiente, con el método de acuerdo con la invención se pueden clasificar los resultados o respuestas del inmunoensayo específico y no específico, así como las respuestas monoméricas y oligoméricas.

Una realización de los aspectos de la presente invención es que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo en puente de doble antígeno que utiliza un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador.

10 Una realización de los aspectos de la invención es que dicho anticuerpo farmacológico es un anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En una realización, dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo para el tratamiento de la artritis reumatoide o la artrosis. En otra realización dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo frente al receptor de IL-6, o frente al receptor de IGF-1, o el receptor de IL-13 1 alfa. Una realización de los aspectos de la presente invención incluye que dicho anticuerpo farmacológico de captura es una mezcla de dicho anticuerpo farmacológico, que incluye, al menos, dos de tales anticuerpos farmacológicos que difieren en el lugar del anticuerpo en el que se conjugan con la fase sólida, y el anticuerpo farmacológico trazador es una mezcla de dicho anticuerpo farmacológico que incluye, al menos, dos de tales anticuerpos farmacológicos que difieren en el lugar del anticuerpo en el que se conjugan con el marcador detectable. Una realización adicional es que la conjugación del anticuerpo farmacológico con su compañero de conjugación se realiza mediante la unión química mediante grupos N-terminal y/o grupos ε-amino (lisina), grupos ε-amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrido, hidroxilo y/o fenólicos del esqueleto de aminoácidos del anticuerpo farmacológico y/o grupos alcohol glucídicos de la estructura glucídica del anticuerpo farmacológico. En una realización de los aspectos de la invención, la mezcla del anticuerpo farmacológico de captura o la mezcla del anticuerpo farmacológico trazador incluye el anticuerpo farmacológico conjugado mediante un grupo amino y mediante una estructura glucídica a su compañero de conjugación. En una realización adicional, la conjugación del anticuerpo farmacológico de captura con la fase sólida se lleva a cabo mediante la adsorción pasiva o mediante un par de unión específico. En una realización de la invención, el par de unión específico (primer componente/segundo componente) es estreptavidina o avidina/biotina, o anticuerpo/antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), o lectina/polisacárido, o esteroide/proteína de unión a esteroides, o hormona/receptor de hormonas, o enzima/sustrato, o IgG/proteína A y/o G. En una realización, el anticuerpo farmacológico de captura se conjuga con la biotina y la conjugación a la fase sólida se lleva a cabo mediante avidina o estreptavidina inmovilizadas. Aún en otra realización de los aspectos de la invención, el anticuerpo farmacológico trazador se conjuga con el marcador detectable mediante un par de unión específico. En una realización, el anticuerpo farmacológico trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcador detectable se realiza mediante un anticuerpo frente a digoxigenina. En otra realización de los aspectos de la presente invención, la proporción de anticuerpo farmacológico de captura respecto al anticuerpo farmacológico trazador es de entre 1:10 y 50:1 (proporción significa la proporción de moléculas de anticuerpo independientemente del peso molecular de los conjugados, que puede ser diferente).

40 Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar el tipo de respuesta del sistema inmunológico hacia un anticuerpo farmacológico administrado, especialmente un anticuerpo terapéutico. Con este método es posible distinguir si un anticuerpo antifármaco detectado es uno de los siguientes:

- 45 i) un anticuerpo antifármaco monomérico y específico, o
- ii) un anticuerpo antifármaco oligomérico y específico, o
- iii) un anticuerpo anti IgG humano oligomérico y no específico, o
- 50 iv) un anticuerpo anti IgG humano monomérico y no específico, o
- v) un anticuerpo inespecífico

Por consiguiente, la presente invención incluye un método para determinar el tipo de anticuerpo frente a un anticuerpo farmacológico (anticuerpo antifármaco) presente en una muestra mediante la utilización de un inmunoensayo en puente de doble antígeno que incluye un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador, en el que el método incluye los siguientes pasos:

- 5 a) proporcionar
- 10 a-i) dicho anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,
- 10 a-ii) dicho anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,
- 15 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con
- 15 b-i) dicha muestra,
- 20 b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,
- 20 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,
- 25 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica con anterioridad al inmunoensayo,
- 30 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica con anterioridad al inmunoensayo,
- 30 c) determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco monomérico y específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o
- 35 determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco oligomérico específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-iii), o
- 35 determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano no específico oligomérico mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-ii) y b-iv) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v), o
- 40 determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo inespecífico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii), b-iii), b-iv) y b-v), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano no específico monomérico mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii), b-iii), b-iv) y b-v).

45 Los siguientes ejemplos, referencias y figuras se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención, y el verdadero ámbito de ésta se describe en la reivindicaciones anejadas. Debe entenderse que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos descritos sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

50 Figura 1 Ensayo en puente para la detección de anticuerpos antifármaco: El anticuerpo farmacológico biotinilado (Captura-BI) se une a una placa microtitulada recubierta con estreptavidina (SA-MTP); el anticuerpo antifármaco une el anticuerpo farmacológico de captura (Captura-BI; BI=biotinilado) con el anticuerpo farmacológico trazador marcado con digoxigenina (Trazador-DIG; DIG=digoxigenilado); el complejo inmovilizado se detecta mediante un conjugado de peroxidasa de rábano anti-digoxigenina policlonal (DIG- ρ Ab-POD); los anticuerpos antifármaco policlonales de conejo (rpAb) se utilizan como estándar.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

60 Biotinilización del anticuerpo mAb IL-6R con el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico

El anticuerpo frente al receptor de IL-6 (mAb IL-6R) se dializó frente al tampón (100 mM de tampón de fosfato potásico (en adelante, K-PO₄), pH de 8,5)). Después la solución se ajustó a una concentración de proteínas de 10 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar 1:5. Después de 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la

adición de L-lisina. Se sustrajo el exceso del reactivo marcador mediante diálisis frente a 25 mM de K-PO₄ suplementado con 150 mM de NaCl, pH de 7,5.

Ejemplo 2

5 Biotinización del anticuerpo mAb IL-6R con el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico tras el tratamiento con anhídrido de ácido citracónico

10 El mAb IL-6R se dializó frente a 100 mM de K-PO₄, pH de 8,5. Después la solución se ajustó a una concentración de proteínas de 20 mg/ml. El ácido citracónico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:5. Después de 120 minutos, la reacción se detuvo mediante cromatografía en una columna con Sephadex[®] G25 equilibrada con 100 mM de K-PO₄, pH de 8,4. La solución del anticuerpo se ajustó a una concentración de proteínas de aproximadamente 4 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:5.

15 Después de 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina. Se sustrajo el exceso del reactivo marcador mediante diálisis frente a 200 mM del tampón de acetato sódico, pH de 5,0. La solución del anticuerpo se transfirió a 25 mM de K-PO₄ suplementado con 150 mM de NaCl, pH de 7,2, mediante cromatografía en una columna de Sephadex[®] G25.

20 Ejemplo 3

Biotinización del mAb IL-6R con hidracida de biotina

25 El mAb IL-6R se dializó frente a 100 mM de tampón de acetato sódico, pH de 5,5. Después la solución se ajustó a una concentración de proteínas de 20 mg/ml. El peryodato sódico se disolvió en 100 mM del tampón de acetato sódico, pH de 5,5, y se añadió a la solución del anticuerpo hasta una concentración final de 10 mM. Después de 30 minutos, la reacción se detuvo mediante cromatografía en una columna con Sephadex[®] G25 equilibrada con 100 mM del tampón de acetato sódico, pH de 5,5. La solución del anticuerpo se ajustó a una concentración de proteínas de aproximadamente 5 mg/ml. La hidracida de biotina se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:50. Después de 120 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de borohidruro sódico hasta una concentración final de 15 mM. Después de 30 minutos, la solución del anticuerpo se dializó frente a 25 mM de K-PO₄ suplementado con 150 mM de NaCl, pH 7,2.

35 Ejemplo 4

Digoxigenilización del mAb IL-6R con el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico de digoxigenina

40 El mAb IL-6R se dializó frente al tampón de digoxigenilización (100 mM de K-PO₄, pH de 8,5). Después la solución se ajustó a una concentración de proteínas de 10 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico de digoxigenina se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar 1:5. Después de 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina. Se sustrajo el exceso del reactivo marcador mediante diálisis frente a 25 mM de K-PO₄ suplementado con 150 mM de NaCl, pH de 7,5.

45 Ejemplo 5

50 Digoxigenilización del mAb IL-6R con el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico de digoxigenina tras el tratamiento con anhídrido de ácido citracónico

55 El mAb IL-6R se dializó frente a 100 mM de K-PO₄, pH de 8,4. Después la solución se ajustó a una concentración de proteínas de 20 mg/ml. El ácido citracónico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:5. Después de 120 minutos, la reacción se detuvo mediante cromatografía en una columna con Sephadex[®] G25 equilibrada con 100 mM de K-PO₄, pH de 8,4. La solución del anticuerpo se ajustó a una concentración de proteínas de aproximadamente 4 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico de digoxigenina se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:5. Después de 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina. Se sustrajo el exceso del reactivo marcador mediante diálisis frente a 200 mM del tampón de acetato sódico, pH de 5,0. La solución del anticuerpo se transfirió a 25 mM de K-PO₄ suplementado con 150 mM de NaCl, pH de 7,2, mediante cromatografía en una columna de Sephadex[®] G25.

60 Ejemplo 6

65 Digoxigenilización del mAb IL-6R con digoxigenina-X-hidracida

El mAb IL-6R se ha dializado frente a 100 mM de tampón de acetato sódico, pH de 5,5. Después la solución se ajustó a una concentración de proteínas de 20 mg/ml. El peryodato sódico se disolvió en 100 mM del tampón de acetato sódico, pH de 5,5, y se añadió a la solución del anticuerpo hasta una concentración final de 10 mM. Después de 30 minutos, la reacción se detuvo mediante cromatografía en una columna con Sephadex® G25 equilibrada con 100 mM del tampón de acetato sódico, pH de 5,5. La solución del anticuerpo se ajustó a una concentración de proteínas de aproximadamente 5 mg/ml. La digoxigenina-X-hidracida se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:50. Después de 120 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de borohidruro sódico hasta una concentración final de 15 mM. Después de 30 minutos, la solución del anticuerpo se dializó frente a 25 mM de K-PO₄ suplementado con 150 mM de NaCl, pH 7,2.

Ejemplo 7

a) Generación del anticuerpo farmacológico en forma oligomérica

El anticuerpo farmacológico (IgG) recombinante, por ejemplo el anticuerpo anti-IL-6R, el anticuerpo anti-IGF-1R, o el anticuerpo anti-IL-13R, se dializó frente a 150 mM del tampón de fosfato potásico suplementado con 100 mM de NaCl, pH de 8,4, y después la solución del anticuerpo se concentró a una concentración del anticuerpo de 55 mg/ml.

El disuccinimidilsuberato (DSS) se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:7 (IgG:DSS). La mezcla se incubó a 25°C y a pH de 8,4 con agitación, y la reacción se analizó con una cromatografía analítica de filtración en gel (utilizando, por ejemplo, una columna TSK 4000). Habitualmente, la polimerización se detuvo tras 60 min. mediante la adición de lisina hasta una concentración final de 10 mM. Después de 45 min. de incubación a 25 °C se separó el anticuerpo farmacológico polimerizado mediante filtración en gel (utilizando, por ejemplo, una columna Sephacril S400) para sustraer las fracciones moleculares pequeñas.

b) Generación de la IgG humana en forma oligomérica

La IgG humana purificada a partir de suero humano mediante cromatografía de intercambio iónico se dializó frente a 150 mM del tampón de fosfato potásico que contiene 100 mM de NaCl, pH de 8,4, y se concentró la solución de proteínas a una concentración de proteínas de 75 mg/ml. El disuccinimidilsuberato (DSS) se disolvió en DMSO y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (IgG:DSS). La mezcla se incubó a 25°C y a pH de 8,4 con agitación, y la reacción se analizó con una columna de filtración en gel analítica (utilizando, por ejemplo, una columna TSK 4000). Habitualmente, la polimerización se detuvo tras 60 min. mediante la adición de lisina hasta una concentración final de 10 mM. Después de 45 min. de incubación a 25 °C se separó la IgG oligomérica humana mediante filtración en gel (utilizando, por ejemplo, una columna Sephacril S400) para sustraer las fracciones moleculares pequeñas.

Ejemplo 8

Base del ensayo

El ELISA utiliza el anticuerpo farmacológico inmovilizado (Captura-BI) en placas microtituladas con estreptavidina (SA-MTP) para la captura de la muestra que contiene anticuerpos antifármaco (ADA). Los ADA capturados se detectan con el anticuerpo farmacológico digoxigenilizado (Trazador-DIG). El complejo unido de ADA y Trazador-DIG se detecta mediante un anticuerpo anti-DIG policlonal conjugado con peroxidasa, que reacciona con su sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y la subsiguiente lectura fotométrica. La densidad óptica (OD) se mide a 405 nm (con una longitud de onda de referencia de 490 nm). Para la determinación de una curva estándar, la muestra se reemplaza por una solución de un anticuerpo antifármaco a una concentración definida. La concentración estándar mayor debe alcanzar un valor de OD de 1,8-2,2 AU.

En el primer paso, todas las muestras se cribaron según fueran positivas o negativas para anticuerpos antifármaco (ADA) (ensayo de cribado; respuesta sí/no) mediante la evaluación de todas las muestras a una dilución de 1:20. El punto de corte positivo/negativo se determinó a un intervalo de confianza del 95 % utilizando la respuesta del ensayo, es decir, la densidad óptica (OD) de múltiples análisis de muestras control de suero.

En un segundo paso, todas las muestras positivas se evaluaron de nuevo mediante la utilización de, como máximo, cuatro pasos de distinción adicionales para caracterizar la respuesta (por ejemplo especificidad farmacológica):

i) muestra no enriquecida

ii) enriqueciendo la muestra con 1 mg/ml del anticuerpo farmacológico en forma monomérica

iii) enriqueciendo la muestra con 1 mg/ml del anticuerpo farmacológico en forma oligomérica

iv) enriqueciendo la muestra con 1 mg/ml de la IgG humana en forma monomérica

v) enriqueciendo la muestra con 1 mg/ml de la IgG humana en forma oligomérica

5 En los pasos de distinción el ELISA se realizó de nuevo tal y como se describe con anterioridad (ensayo de cribado), pero la muestra se incubó previamente a la aplicación en las placas microtituladas con las soluciones ii)-v), tal y como se describe con anterioridad para los cuatro pasos de distinción. Las sustancias enriquecidas compiten con el
 10 captura-BI por la unión a sustancias (por ejemplo, ADA) de la muestra. La señal del ensayo de la muestra no enriquecida debe estar en el rango dinámico del ensayo, de lo contrario la muestra debe diluirse adicionalmente. Esta dilución de la muestra final también debe utilizarse en todos los pasos de distinción. Si la disminución de la
 15 absorbancia debido a la presencia de reactivos enriquecidos (ii) - v)) es menor del 20 %, el resultado de la evaluación se consideró "positivo" (inmunoensayo positivo). Si la disminución de la absorbancia fue del 20 % o mayor, el resultado de la evaluación se consideró "negativo" (inmunoensayo negativo). En otras palabras, si la recuperación de la señal era mayor del 80 %, el resultado de la evaluación se consideró "positivo" (inmunoensayo positivo) y si la recuperación de la señal fue menor del 80 %, el resultado de la evaluación se consideró "negativo" (inmunoensayo negativo).

Ejemplo 9

20 ELISA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpos-IL-6R

El ensayo se ha realizado de acuerdo con el ejemplo 8. Excepción: la muestra (enriquecida o no enriquecida) se pre-incubó con el fármaco-DIG durante una hora. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 1.

25 Tabla1: Resultados del ELISA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpos-IL-6R

	Respuesta oligomérica no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta inespecífica del anticuerpo antifármaco	Respuesta oligomérica no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica no específica del anticuerpo antifármaco
Muestra no enriquecida	+	+	+	+	+	+
Señal recuperada en las muestras enriquecidas	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
ii) anticuerpo anti-IL-6R en forma monomérica	96,5 +	95,1 +	93,2 +	27,9 -	2,88 -	63,3 -
iii) anticuerpo anti-IL-6R en forma oligomérica	41,1 -	92,0 +	12,2 -	15,3 -	BLQ -	12,1 -
iv) anticuerpo IgG humano en forma monomérica	91,9 +	103,9 +	88,9 +	90,8 +	107,0 +	73,0 -
v) anticuerpo IgG humano en forma oligomérica	41,9 -	98,3 +	14,9 -	93,7 +	100,0 +	22,5 -
BLQ= por debajo del límite de cuantificación						

Ejemplo 10

ELISA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpos-IGF-1R

5

El ensayo se ha realizado de acuerdo con el ejemplo 8. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: Resultados del ELISA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpos-IGF-1R

	Respuesta no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta oligomérica específica del anticuerpo antifármaco (IgM)	Respuesta monomérica específica del anticuerpo antifármaco (IgG)
Muestra no enriquecida	+	+	+
Señal recuperada en las muestras enriquecidas	[%]	[%]	[%]
ii) anticuerpo anti-IGF-1R en forma monomérica	91,4 +	89,5 +	0,90 -
iii) anticuerpo anti-IGF-1R en forma oligomérica	82,7 +	62,4 -	0,32 -
iv) anticuerpo IgG humano en forma monomérica	109,1 +	94,4 +	95,2 +
v) anticuerpo IgG humano en forma oligomérica	111,2 +	96,1 +	97,4 +

10

Ejemplo 11

ECLIA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpos-IL-13R

15

El ensayo se ha realizado de acuerdo con ejemplo 8. Excepción: este es un ensayo que utiliza electroquimioluminiscencia como método de detección. Esto significa que se utilizó un anticuerpo farmacológico marcado con rutenio como Trazador-DIG en vez del anticuerpo farmacológico digoxigenilizado y del anticuerpo anti-DIG conjugado con peroxidase. Los resultado se muestran en la siguiente tabla 3.

20

Tabla 3: Resultados del ECLIA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpos-IL-13R

	Respuesta monomérica no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica específica del anticuerpo antifármaco
Muestra no enriquecida	+	+	+
Señal recuperada en las muestras enriquecidas	[%]	[%]	[%]
ii) anticuerpo anti-IL-13R en forma monomérica	3,96 -	10,87 -	0,08 -

ES 2 407 603 T3

	Respuesta monomérica no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica no específica del anticuerpo antifármaco	Respuesta monomérica específica del anticuerpo antifármaco
iii) anticuerpo anti-IL-13R en forma oligomérica	BLQ -	BLQ -	0,20 -
iv) anticuerpo IgG humano en forma monomérica	BLQ -	0,61 -	90,84 +
v) anticuerpo IgG humano en forma oligomérica	BLQ -	BLQ -	85,35 +
BLQ= por debajo del límite de cuantificación			

REIVINDICACIONES

1. El método para determinar si un anticuerpo presente en una muestra es un anticuerpo antifármaco específico o un anticuerpo antifármaco no específico con un inmunoensayo, en el que dicho método incluye los siguientes pasos:

- 5 a) proporcionar
 - 10 a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,
 - 15 a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,
- 15 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con
 - 20 b-i) dicha muestra,
 - 25 b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,
 - 30 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,
 - 35 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,
 - 40 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,
- 45 c) determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco no específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

2. El método para distinguir en una muestra un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio humanizado de un anticuerpo anti IgG humano con un inmunoensayo, en el que el método incluye los siguientes pasos:

- 35 a) proporcionar
 - 40 a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,
 - 45 a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,
- 50 b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con
 - 55 b-i) dicha muestra,
 - 60 b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,
 - 65 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,
 - 70 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,
 - 75 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,
- 80 c) determinar un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico antiinflamatorio humanizado mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

3. El método para determinar si un anticuerpo antifármaco en una muestra está en forma monomérica o en forma oligomérica con un inmunoensayo, en el que el método incluye los siguientes pasos:

- a) proporcionar

a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

5 a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

10 b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,

b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,

15 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,

b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,

20 c) determinar que el anticuerpo antifármaco en la muestra está en forma monomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-ii) y b-iv), y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

α) un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o

25 β) un inmunoensayo negativo en b-ii), b-iii), b-iv), y b-v),

o
determinar que un anticuerpo antifármaco en la muestra está en forma oligomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i), y

30 α) un inmunoensayo negativo en b-iii), o

β) un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v),

en el que todos los otros inmunoensayo no enumerados son positivos.

35 4. El método para determinar el tipo de anticuerpo frente a un anticuerpo farmacológico presente en una muestra con un inmunoensayo, en el que el método incluye los siguientes pasos:

a) proporcionar

40 a-i) un anticuerpo farmacológico de captura, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con una fase sólida,

45 a-ii) un anticuerpo farmacológico trazador, que es dicho anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura, de manera separada, con

b-i) dicha muestra,

50 b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma monomérica,

b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido tal anticuerpo farmacológico en forma oligomérica,

55 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma monomérica,

b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,

60 c) determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco monomérico específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o

determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo antifármaco oligomérico específico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii), b-iv) y b-v), y un inmunoensayo negativo en b-iii), o

65 determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano no específico oligomérico mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-ii) y b-iv) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v), o

determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo inespecífico mediante un inmunoensayo positivo en b-i), b-ii), b-iii), b-iv) y b-v), o determinar que un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti IgG humano no específico monomérico mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii), b-iii), b-iv) y b-v).

- 5
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado de manera que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo en puente de doble antígeno que incluye un anticuerpo farmacológico de captura y un anticuerpo farmacológico trazador.
- 10
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado de manera que dicho anticuerpo farmacológico es un anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado de manera que dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo para el tratamiento de la artritis reumatoide o la artrosis.
- 15
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado de manera que dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo frente al receptor de IL-6, o frente al receptor de IGF-1, o el receptor de IL-13 1 alfa.
- 20
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado de manera que la conjugación del anticuerpo farmacológico de captura con la fase sólida se realiza mediante adsorción pasiva o mediante un par de unión específico.
- 25
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado de manera que el anticuerpo farmacológico de captura se conjuga con biotina y la conjugación con la fase sólida se realiza mediante avidina o estreptavidina inmovilizadas.
- 30
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado de manera que el método incluye, tras el paso b), un paso ba) adicional de
- ba) poner en contacto dicho anticuerpo farmacológico de captura contactado con dicha muestra en el paso b) con dicho anticuerpo farmacológico trazador
- 35
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado de manera que el anticuerpo farmacológico trazador se conjuga con el marcador detectable mediante un par de unión específico.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado de manera que el anticuerpo farmacológico trazador se conjuga con digoxigenina y la unión al marcador detectable se realiza mediante un anticuerpo frente a digoxigenina.
- 40
14. Un equipo para determinar un anticuerpo antifármaco frente a un anticuerpo farmacológico en una muestra que incluye:
- 45
- a) una placa microtitulada recubierta con estreptavidina,
- b) un reactivo para la conjugación de un anticuerpo farmacológico con la biotina,
- c) un reactivo para la conjugación de dicho anticuerpo farmacológico con la digoxigenina,
- 50
- d) un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano,
- e) un reactivo para la oligomerización de dicho anticuerpo farmacológico,
- 55
- f) inmunoglobulina G humana en forma monomérica, y
- g) inmunoglobulina G humana en forma oligomérica.

Fig. 1

