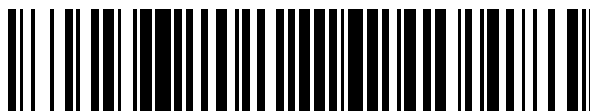


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 483**

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 12196714 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2573568**

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:

27.03.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacher Strasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR y

ZADAK, MARKUS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 532 483 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 comprende un método para distinguir la presencia de anticuerpos anti-fármacos específicos y no específicos en una muestra, así como equipos para el uso de tal método.

Antecedentes de la invención

- 10 Los inmunoensayos en fase sólida estándar con anticuerpos monoclonales implican la formación de un complejo entre el anticuerpo adsorbido en una fase sólida (anticuerpo de captura), el antígeno, y el anticuerpo a otro epítipo del antígeno conjugado con un marcador detectable, por ejemplo, una enzima (anticuerpo trazador). Por lo tanto, se forma un sándwich: fase sólida - anticuerpo de captura - antígeno - anticuerpo trazador. En la reacción catalizada por el sándwich, la actividad del anticuerpo - enzima conjugada es proporcional a la concentración de antígeno en el medio de incubación. El método sándwich estándar también se llama inmunoensayo de puente de doble antígeno ya que los anticuerpos de captura y de trazadores se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno. Hoesel, W., et al., J. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110, informan de un ensayo de puente de doble antígeno anti-EPO mediante el cual se utilizó una mezcla de rhEPO inmovilizado acoplado a grupos amino y grupos carbohidrato. Los inmunoensayos tales como el ELISA puente de doble antígeno son tipos de ensayo comunes en la investigación de una respuesta inmunogénica de un paciente a un anticuerpo de un medicamento. Mire-Sluis, A. R., et al., J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16, resume las recomendaciones para el diseño y optimización de inmunoensayos basados en la detección de anticuerpos del huésped contra los productos biotecnológicos. Según Mire-Sluis et al. los formatos de ensayo de anticuerpos anti-fármacos conocidos muestran desventajas considerables. Se mencionan ensayos de anticuerpos anti-fármacos, por ejemplo, en el documento WO 2005/045058 y WO 90/006515. Se mencionan ensayos de anticuerpos anti-idiotípicos, por ejemplo, en el documento US 5.219.730, 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 productos biológicos terapéuticos. Los principios de 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, describen la inmovilización orientada de anticuerpos para el uso en inmunoensayos. Los inmunoensayos mediados por avidina-biotina se describen, por ejemplo, en Wilchek, M., y Bayer, EA, Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469. Una comparación de ELISA y resonancia de plasmón superficial se describe en Lofgren, J.A., et al., J. Immunol. 178 (2007) 7467 - 7472.

- 35 Lofgren, J. A., et al. describió la comparación de ELISA y resonancia de plasmones de superficie para evaluar la inmunogenicidad clínica de Panitumumab (J. Immunol. 178 (2007) 7467-7472).

Resumen de la invención

- 40 El primer aspecto de la presente invención es un método para la determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármacos (anticuerpo antifármaco, ADA) en una muestra usando un inmunoensayo que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho método comprende los siguientes pasos:

- 45 a) proporcionar

a-i) dicho anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) dicho anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

- 50 b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos separadamente con

b-i) dicha muestra,
b-ii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,
b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

- 55 c) determinar un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármacos en dicha muestra mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).

- 60 Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar la presencia de anticuerpos anti-fármacos oligoméricos en una muestra con un inmunoensayo, en el que el método comprende los siguientes pasos:

- a) proporcionar

a-i) dicho anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) dicho anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

- 65

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármaco en forma monomérica,

5 b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica,

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

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

10 c) determinar si el anticuerpo anti-fármaco en una muestra está en forma oligomérica mediante un inmunoensayo positivo en bi) y bii) y b-vi) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-iii).

La clase de un anticuerpo anti-fármaco se determina de acuerdo a la siguiente tabla:

	anticuerpo de fármaco específico, respuesta monomérica	anticuerpo de fármaco específico, respuesta oligomérica	anticuerpo de fármaco inespecífico, respuesta oligomérica	anticuerpo de fármaco inespecífico, respuesta monomérica	anticuerpo de fármaco inespecífico, respuesta
Muestra no adicionada b-i)	+	+	+	+	+
b-ii)	-	+	+	-	+
b-iii)	-	-	-	-	+
b-iv)	+	+	+	-	+
b-v)	+	+	-	-	+

15 Un aspecto final de la presente invención es un método para determinar la presencia de anticuerpos anti-fármacos monoméricos en una muestra con un inmunoensayo, en el que el método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

20 a-i) un anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,

a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

25 b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica,

b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica,

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

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

30 c) determinar si el anticuerpo anti-fármaco en una muestra está en forma monomérica mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).

35 En una realización de los aspectos de la invención, dicho inmunoensayo es un inmunoensayo de puente de doble antígeno que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco. Otra forma de realización de los aspectos de la invención es que dicho anticuerpo es un anticuerpo de fármacos 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 osteoartritis. En otra realización dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo contra el receptor de IL-6, o contra el receptor de IGF-1, o contra el receptor alfa 1 de IL-13. Una forma de realización de los aspectos de la presente invención comprende que dicho anticuerpo de captura de fármacos es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármacos que difieren en el sitio de anticuerpo en el que se conjugan a la fase sólida, y el anticuerpo trazador de fármaco es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármacos que difieren en el sitio de anticuerpo en la que se conjugan con el marcaje detectable. Una realización adicional es que la conjugación del anticuerpo de fármacos a su socio de conjugación se lleva a cabo mediante la unión química a través de grupos N-terminal y / o ε-amino (lisina), los grupos ε-amino de diferentes grupos funcionales de lisinas, carboxi-, sulfhidrido-, hidroxilo- y / o fenólicos de la cadena principal de aminoácidos del anticuerpo de fármacos y / o grupos alcohol de azúcar de la estructura de carbohidrato del anticuerpo de fármacos. En una forma de realización de aspectos de la invención, la mezcla de anticuerpos de captura de fármacos o la mezcla de anticuerpos trazador de fármacos comprende un anticuerpo conjugado de fármacos a través de un grupo amino y un anticuerpo conjugado de fármacos a través de una estructura de carbohidrato a su pareja de conjugación. En una realización adicional la conjugación del anticuerpo de captura de fármacos a la fase sólida se lleva a cabo por adsorción pasiva o a través de una pareja de unión específica. En una realización de la invención, la pareja de unión específica (primer componente / segundo

componente) se selecciona de estreptavidina o avidina / biotina, o anticuerpo / antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), o lectina / polisacárido, o esteroides / proteína de unión a esteroides, u hormona / receptor de hormona, o enzima / sustrato, o IgG / proteína A y / o proteína G. En una realización, el anticuerpo de captura de fármacos está conjugado a biotina y la conjugación a la fase sólida se lleva a cabo a través de avidina o estreptavidina inmovilizada. En una realización de los aspectos de la presente invención el método comprende después del paso b) un paso adicional ba) de poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos en contacto con dicha muestra en el paso b) con dicho anticuerpo trazador de fármaco y detectar el marcador detectable. En aún otra realización de los aspectos de la invención, el anticuerpo trazador de fármaco se conjuga con el marcador detectable a través de una pareja de unión específica. En una realización, dicho anticuerpo trazador de fármaco se conjuga con digoxigenina y la unión al marcador detectable se realiza mediante un anticuerpo contra digoxigenina. Otra forma de realización de los aspectos de la presente invención es que la relación de anticuerpo de captura de fármaco respecto al anticuerpo trazador de fármaco es de 1:10 a 50: 1 (relación significa la proporción de moléculas de anticuerpos, independientemente del peso molecular de los conjugados que pueden ser diferentes).

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un método para la determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármacos en una muestra usando un inmunoensayo que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

a-i) dicho anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) dicho anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica,

b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica,

c) la determinación de un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármacos en dicha muestra mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).

El término "anticuerpo de fármacos" de acuerdo con la invención denota un anticuerpo que puede ser administrado a un individuo, de modo que una muestra de dicho individuo se sospecha que comprende dicho anticuerpo de fármaco después de la administración. Dentro de un ensayo realizado de acuerdo con la invención, el anticuerpo de fármacos, el anticuerpo de captura de fármacos y el anticuerpo trazador de fármaco comprenden la "misma" molécula de anticuerpo, por ejemplo, recombinantemente producido con el mismo vector de expresión y que comprende la misma secuencia de aminoácidos. Los anticuerpos de fármacos (anticuerpos monoclonales terapéuticos) se utilizan ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo tumores hematológicos y sólidos, incluyendo linfoma no Hodgkin, cáncer de mama y cáncer colorrectal) o enfermedades inflamatorias. Dichos anticuerpos se describen en, por ejemplo, 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 Harris, M., Lancet Oncol. 5 (2004) 292-302. Ejemplos de anticuerpos son, por ejemplo, los anticuerpos contra CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Y Levis, receptor IL-6, receptor IGF-1, o receptor 1 alfa de IL-13. En una realización, dicho anticuerpo de fármaco es un anticuerpo que es útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, es decir, un anticuerpo antiinflamatorio, tal como un anticuerpo anti-receptor de IL-6, o un anticuerpo anti-receptor de IGF-1, o un anticuerpo anti-receptor alfa 1 de IL-13.

Un ejemplo de anticuerpo (preferiblemente monoclonal) es un anticuerpo contra el receptor de IL-6 (IL-6R mAb). 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 el documento WO 2004/096274.

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

Un ejemplo de anticuerpo (preferiblemente monoclonal) es un anticuerpo contra el receptor alfa de IL-13 (también indicada como mAb IL-13Ra1 o mAb IL-13R a continuación). Los anticuerpos contra IL-13Ra1 se conocen a partir de, por ejemplo, WO 96/29417, WO 97/15663, 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., Cytokine 13 (2001) 75-84, y están disponibles comercialmente de, por ejemplo, R & D Systems Inc. EE.UU. Otros ejemplos de anticuerpos contra IL-13Ra1 se describen en el documento WO 2006/072564.

El término "anticuerpo anti-fármaco" tal como se utiliza en esta solicitud denota un anticuerpo, que está dirigido contra, es decir, se une a, una región antigénica de un anticuerpo de fármacos. Esta región antigénica puede ser la región variable, una CDR, la región constante, o la glicestructura del anticuerpo de fármacos. En una realización, dicho anticuerpo anti-fármaco se dirige contra una región CDR de dicho anticuerpo de fármaco o una modificación secundaria de dicho anticuerpo de fármaco resultante de la producción recombinante de dicho anticuerpo de fármaco en células no humanas, tales como, células CHO, células HEK, células Sp2/0, o células BHK. Generalmente los anticuerpos anti-fármacos están dirigidos contra una región antigénica de un anticuerpo de fármacos que es reconocido por el sistema inmune de un animal al que se administra el anticuerpo de fármacos. Los anticuerpos descritos anteriormente se denominan "anticuerpos específicos anti-fármacos". Los anticuerpos de fármacos están diseñados para comprender tan pocas regiones antigénicas como sea posible. Por ejemplo, los anticuerpos de medicamentos destinados al uso en seres humanos son humanizados antes de la aplicación a un paciente humano con el fin de minimizar la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo de fármacos. Esta respuesta inmune sería en forma de anticuerpos anti-fármacos que están dirigidos contra las partes no humanas de un fármaco de dichos anticuerpos humanizados, como por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad en los dominios variables (véase, por ejemplo Pan, Y., et al., FASEB J. 9 (1995) 43-49).

El término "anticuerpo anti-IgG humano" denota un anticuerpo humano contra una región antigénica de un anticuerpo humano o humanizado de la clase de anticuerpos G. Dicho anticuerpo anti-IgG humano es un ejemplo de un " anticuerpo anti-fármaco no-específico". El término "anticuerpo anti-fármaco no-específico" denota dentro de esta solicitud un anticuerpo que se une al anticuerpo de fármacos, pero también se une a una multitud de otros anticuerpos, tales como anticuerpos humanos endógenos, debido a la unión a un sitio antigénico común que no determina la especificidad del anticuerpo de fármacos.

Los anticuerpos contienen como proteínas un número de 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 de azúcar alcohólicos. Estos se pueden emplear para el acoplamiento a una pareja de unión como una superficie, una proteína, un polímero (tal como por ejemplo PEG, celulosa o Polystyrol), una enzima, o un miembro de una pareja de unión (véase, por ejemplo, Aslam M., y Dent, A., Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100).

Uno de los grupos reactivos más comunes de las proteínas es la ϵ -amina alifático del aminoácido lisina. En general, casi todos los anticuerpos contienen abundante lisina. Las aminas de la lisina son razonablemente buenos nucleófilos por encima de pH 8,0 ($pK_a = 9,18$) y por lo tanto reaccionan fácil y limpiamente con una variedad de reactivos para formar enlaces estables. Otro grupo reactivo común en anticuerpos es el residuo tiol del aminoácido cistina que contiene azufre y su producto de reducción cisteína (o media cistina). La cisteína contiene un grupo tiol libre, que es más nucleófilo que las aminas y generalmente es el grupo funcional más reactivo en una proteína. Los tioles son generalmente reactivos a pH neutro, y por lo tanto pueden ser acoplados a otras moléculas selectivamente en presencia de aminas. Dado que los grupos sulfhidrilo libres son relativamente reactivos, las proteínas con estos grupos a menudo existen con ellos en su forma oxidada como grupos disulfuro o enlaces disulfuro. Además de cistina y cisteína, algunas proteínas también tienen el aminoácido metionina, que contienen azufre en un enlace tioéter. La literatura describe el uso de varios reactivos tiolantes de reacción cruzada tal como el reactivo de Traut (2-iminotiolano), succinimidilo (tioacetilo) acetato de etilo (SATA), o hexanoato de sulfosuccinimidil 6-[3-(2-piridilditio)propionamido] (sulfo-LC-SPDP) para proporcionar una forma eficaz de introducir múltiples grupos sulfhidrilo a través de grupos amino reactivos. Ésteres reactivos, particularmente ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), son algunos de los reactivos más comúnmente empleados para la modificación de grupos amino. El pH óptimo para la reacción en un ambiente acuoso es un pH de 8,0 a 9,0. Los isotiocianatos son reactivos de modificación de amina y forman enlaces tiourea con proteínas. Ellos reaccionan con aminas de proteínas en solución acuosa (de forma óptima a un pH entre 9,0 y 9,5). Los aldehídos reaccionan en condiciones acuosas suaves con aminas alifáticas y aromáticas, hidrazinas, hidrazidas y para formar una imina intermedia (base de Schiff). Una base de Schiff se puede reducir selectivamente con agentes reductores suaves o fuertes (tales como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio) para derivar un enlace alquilamina estable. Otros reactivos que se han utilizado para modificar aminas son anhídridos de ácido. Por ejemplo, anhídrido dietilentiainopentaacético (DTPA) es un agente quelante bifuncional que contiene dos grupos anhídrido reactivos de amina. Se puede reaccionar con grupos N-terminal y ϵ -amina de proteínas para formar enlaces amida. Los anillos de anhídrido se abren para crear, brazos quelantes de metales polivalentes capaces de unirse fuertemente a metales en un complejo de coordinación.

Otro grupo reactivo común en anticuerpos es el grupo ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutámico). Las proteínas contienen grupos de ácido carboxílico en la posición C-terminal y dentro de las cadenas laterales de ácido aspártico y ácido glutámico. Para la conjugación el grupo ácido carboxílico generalmente se convierte en un éster reactivo mediante el uso de una carbodiimida soluble en agua y se hace reaccionar con un reactivo nucleófilo tal como una amina, hidrazida o hidrazina. El reactivo que contiene amina debe ser débilmente básico con el fin de reaccionar selectivamente con el ácido carboxílico activado en presencia de otras aminas en la proteína. El entrecruzamiento de la proteína puede ocurrir cuando el pH se eleva por encima de 8,0.

El peryodato de sodio puede ser usado para oxidar la parte de alcohol de un azúcar dentro de un grupo carbohidrato a un aldehído. Cada grupo aldehído se puede hacer reaccionar con una amina, hidrazida, o hidrazina como se describe para los ácidos carboxílicos. Dado que el resto de carbohidrato se encuentra predominantemente en la región de fragmento cristalizable (Fc) de un anticuerpo, la conjugación puede lograrse mediante la modificación dirigida al sitio del hidrato de carbono lejos del sitio de unión al antígeno.

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

Las aminas, hidrazidas, hidrazinas y son reactivos reactivas al ácido carboxílico y aldehído (formación de enlaces amida, hidrazona, o alquilamina). Las aminas, hidrazidas, y las hidracinas pueden acoplarse a ácidos carboxílicos de proteínas después de la activación del grupo carboxilo mediante una carbodiimida soluble en agua. El reactivo que contiene amina debe ser débilmente básico para que reaccione selectivamente con la proteína carbodiimida activada en presencia de las ϵ -aminas más altamente básicas de la lisina para formar un enlace amida estable. En la reacción con grupos aldehído, que se pueden generar en anticuerpos por oxidación con peryodato de los residuos de carbohidratos en el anticuerpo, se forma un intermediario de base de Schiff, que se puede reducir en una alquilamina mediante la reducción del intermediario con agentes reductores solubles en agua como cianoborohidruro de sodio (suave y selectivo) o borohidruro de sodio (fuerte).

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

El término "fase sólida", como se usa en esta solicitud denota una sustancia no fluida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y perlas) hechas de materiales como polímero, metal (partículas ferromagnéticas o paramagnéticas), vidrio, y cerámica; sustancias tales como gel de sílice, alúmina y geles de polímero; capilares, que pueden estar hechas de polímero, metal, vidrio, y / o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros recipientes contenedores para 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 en que una "fase sólida" contiene al menos una porción en su superficie, que está destinada a interactuar con el anticuerpo de captura de fármacos. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta o una placa de microtitulación, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como perlas y micropartículas. Las micropartículas también pueden ser utilizadas como una fase sólida para formatos de ensayo homogéneos. Pueden utilizarse diferentes micropartículas que permiten la unión covalente o no covalente de proteínas y otras sustancias. Dichas partículas incluyen partículas de polímero, tales como poliestireno y poli(metacrilato de metilo); partículas de oro, como las 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 por referencia. Los soportes sólidos para los inmunoensayos según la invención se describen ampliamente en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Butler, J.E., *Methods* 22 (2000) 4-23).

Los cromógenos (grupos fluorescentes o luminiscentes y colorantes), enzimas, grupos activos de RMN o partículas de metal, haptenos, por ejemplo, digoxigenina, son ejemplos de marcadores detectables. El marcador detectable también puede ser un grupo de entrecruzamiento fotoactivable, por ejemplo, un grupo azido o azirina. Los quelatos metálicos que pueden ser detectados por electroquimioluminiscencia son también grupos que emiten señales detectables, con preferencia particular a los quelatos de rutenio, por ejemplo, un quelato de rutenio (bispíridil)₃²⁺. Grupos de marcaje de rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en el documento PE 0 580 979, WO 90/005301, WO 90/11511, y WO 92/14138.

Las muestras, en las que un anticuerpo se ha de determinar, a menudo contienen más que el anticuerpo en cuestión. Por lo tanto, no se puede evitar que la determinación por un inmunoensayo resulta en un inmunoensayo positivo, aunque la muestra no contiene dicho anticuerpo a determinar. Para utilizar este tipo de ensayo tales inmunoensayos positivos tienen que ser excluidos o al menos reducidos en una proporción aceptable, por ejemplo, por debajo del 5% de todos los inmunoensayos positivos.

Sorprendentemente, se ha encontrado que los inmunoensayos positivos de una muestra para ser analizados mediante un método para la determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármacos (anticuerpo anti-fármaco, ADA) pueden ser identificados por adicionar la muestra a analizar con el anticuerpo de fármacos y anticuerpo no específico y determinando el resultado del método con estas muestras adicionadas.

- 5 El término "adicionada" tal como se utiliza en esta solicitud denota que a la muestra a analizar se añade una sustancia suplementaria, que puede o no puede 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 anti-fármaco en cuestión en dicha muestra. En una realización, dicha sustancia es un anticuerpo complementario, en otra realización es dicho anticuerpo de fármaco o un anticuerpo específico de la parte Fc, tal como un anticuerpo anti-IgG humano.
- 10 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpos, incluyendo anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos. En una realización, el anticuerpo de fármacos en el método de acuerdo con la invención es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo de antígeno de células T empobrecido (véase, por ejemplo WO 98/33523, WO 98/52976, o WO 00 / 34317). La ingeniería genética de anticuerpos se describe, por ejemplo en Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 y 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.
- 20 Un "fragmento de anticuerpo" denota un fragmento de un anticuerpo completo que ha conservado la capacidad de unirse al mismo antígeno que el anticuerpo completo. Un "anticuerpo completo" es un anticuerpo que consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras y cadenas polipeptídicas pesadas, cada uno de ellas comprende una región variable y una región constante. Un "conjugado de anticuerpo" se refiere a un conjugado de un anticuerpo con un polipéptido adicional. La unión del antígeno no disminuye por la conjugación al polipéptido adicional. "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente los dominios variables de los mismos o al menos la porción de unión a antígeno de los mismos. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab, F(ab)₂, y similares, siempre que retengan 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 enlazadores y métodos para la unión de polipéptidos útiles para la presente invención.
- 25 La "parte Fc" de un anticuerpo no participa directamente en la unión al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras. Dependiendo de 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 además en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, o IgA en IgA1 y IgA2. Según la clase de inmunoglobulina a la que pertenece un anticuerpo de la cadena pesada de las regiones constantes de inmunoglobulinas se denominan α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) y μ (IgM), respectivamente. El anticuerpo de fármacos en los métodos de acuerdo con la invención en una realización pertenece a la clase IgG. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por el experto en la materia y definido sobre la base de la escisión de la papaína del anticuerpo.
- 30 El término "anticuerpo" tal como se utiliza aquí se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de anticuerpos. Los diferentes polipéptidos de los cuales un anticuerpo se compone se denominan dependiendo de su peso como cadena polipeptídica ligera y cadena polipeptídica pesada. Los genes de anticuerpos reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como la miríada de genes de la región variable del anticuerpo. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras individuales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como cadenas sencillas (scFv) (por ejemplo, Huston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood, L., et al, Immunology, Benjamin N.Y., segunda edición (1984); Hunkapiller, T., y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16).
- 35 Un anticuerpo, en general, comprende dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera 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 pesada y ligera comprende una región constante (la porción carboxilo terminal de la cadena polipeptídica). La región constante de la cadena pesada media la unión del anticuerpo i) a células que llevan un receptor gamma Fc (Fc γ R), tales como las células fagocíticas, o ii) a las células que llevan el receptor neonatal Fc (FcRn) también conocido como receptor de Brambell. El dominio variable de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo comprende a su vez diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).
- 40 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos que contienen secuencias parciales derivadas de un anticuerpo no humano y de un anticuerpo humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados se derivan de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor), en la que los residuos de una región hipervariable son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata, conejo, o primate no humano, que tiene la especificidad y afinidad deseada (ver por ejemplo, Morrison, S.L., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238, US 5.204.244). En algunos casos, la región marco (FR) de residuos de anticuerpo humano se sustituyen por los correspondientes

residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender modificaciones adicionales, por ejemplo, residuos de aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Tales modificaciones dan como resultado variantes de dicho receptor o anticuerpo donante, que son homólogas pero no idénticas a la secuencia parental correspondiente. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de un anticuerpo donante no humano y todas o sustancialmente todas las FR son las de un anticuerpo receptor humano. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también al menos una porción de una región constante de anticuerpo, típicamente la de un anticuerpo humano. Los métodos para anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que por lo general se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo no humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de la región marco se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores o primates no humanos.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes sitios antigénicos (determinantes o epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único sitio antigénico en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

El término "anticuerpo en forma monomérica" tal como se utiliza en esta solicitud denota que dicho anticuerpo no se asocia de forma covalente o no covalente con otras moléculas de anticuerpo de la misma especificidad. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-1R es en forma monomérica si no está asociado con un segundo anticuerpo anti-IGF-1R. Esto no excluye que dicho anticuerpo puede estar asociado de forma covalente o no covalente con otros anticuerpos, tales como por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6R.

El término "anticuerpo en forma oligomérica" tal como se utiliza en esta solicitud denota que dicho anticuerpo está asociado de forma covalente o no covalente con otras moléculas de anticuerpo de la misma especificidad. En una realización, el "anticuerpo en forma oligomérica" está asociado covalentemente con además una o más moléculas de anticuerpo de 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 como se utiliza en esta solicitud indica que dos anticuerpos se unen a la misma molécula diana, es decir, el mismo antígeno. Esto no excluye que los dos anticuerpos se unen a diferentes epítomos de dicho antígeno. En una realización, los anticuerpos comprendidos en un anticuerpo en forma oligomérica se unen al mismo antígeno y al mismo epítomo. En otra realización, dichos anticuerpos en un anticuerpo en una forma oligomérica son el mismo anticuerpo monoclonal.

El primer aspecto de la presente invención es un método para la determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármacos en una muestra usando un inmunoensayo que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

a-i) dicho anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) dicho anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra ,

b-ii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

c) determinar un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármacos en dicha muestra por un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).

Este método es especialmente útil si la muestra contiene anticuerpos que no sean el anticuerpo anti-fármaco en cuestión que puede interferir en inmunoensayos para la detección de dicho anticuerpo anti-fármacos y, por lo tanto, resultar en un inmunoensayo positivo. En una realización, los métodos de la presente invención son útiles para la determinación de anticuerpos anti-fármacos de anticuerpos de fármacos utilizado para una terapia anti-inflamatoria. El término "anticuerpos de fármacos utilizados para una terapia anti-inflamatoria" tal como se utiliza en esta solicitud denota que dicho anticuerpo de fármacos se dirige contra un receptor de superficie celular que media la inflamación. Dichos 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, que se trata con dicho anticuerpo de fármaco anti-inflamatorio, debe determinarse, si el resultado positivo del método se basa en un anticuerpo anti-fármaco o en un anticuerpo distinto de un anticuerpo anti-fármaco de la muestra. Un ejemplo de tal caso es una muestra de un sujeto, que tiene una enfermedad autoinmune como el reumatismo, y por lo tanto una muestra obtenida de dicho sujeto contiene los llamados "factores reumáticos". El término "factores reumáticos" como se utiliza en esta solicitud denota anticuerpos que se unen a la IgG humana, para ser más preciso a la parte Fc de la IgG humana. En la mayoría de los casos, estos "factores reumáticos" son moléculas de unión a oligómeros.

Por lo tanto, se ha encontrado sorprendentemente que la interferencia de tales anticuerpos anti-IgG humanos se puede determinar adicionar la muestra a analizar con anticuerpos definidos, ya sea en forma monomérica o en forma oligomérica, y realizar el método para determinar un anticuerpo anti-fármaco con dicha muestra de adicionada y basado en el resultado del método realizado con las diferentes muestras determinando si el inmunoensayo es positivo o no.

En este documento se describe un método para determinar si un anticuerpo presente en una muestra es un anticuerpo anti-fármaco o un anticuerpo anti-IgG humana, es decir, si un anticuerpo presente en la muestra es un anticuerpo anti-fármaco específico o un anticuerpo anti-fármaco no específico, usando un inmunoensayo puente de doble antígeno que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

a-i) dicho anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármacos conjugado a una fase sólida,
a-ii) dicho anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

b-iv) dicha muestra, a la que la IgG humana en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

b-v) dicha muestra, a la que la IgG humana en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

c) determinar si la presencia de un anticuerpo en dicha muestra es un anticuerpo anti-fármaco mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar si la presencia de un anticuerpo en dicha muestra es un anticuerpo anti-IgG humano mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-ii) y b-iv) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

Los términos "inmunoensayo positivo" y "resultado de inmunoensayo positivo", que se utilizan de forma intercambiable dentro de esta solicitud, denota en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementado, que el inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementada produce así una señal por encima del ruido de fondo de dicho inmunoensayo. En una realización, dicho ruido de fondo es la señal media obtenida por la determinación de una multitud de muestras de diferentes individuos, a la que dicho anticuerpo de fármaco no se había administrado, en dicho inmunoensayo más tres veces la desviación estándar del valor medio, es decir, un intervalo de confianza del 95 %. Asimismo los términos "inmunoensayo negativo" y "resultado de inmunoensayo negativo", que se utilizan de forma intercambiable dentro de esta solicitud denota una señal dentro del ruido de fondo de dicho inmunoensayo, es decir, dentro de tres veces la desviación estándar de la señal obtenida con una muestra sin ningún anticuerpo en dicho inmunoensayo.

Los términos "inmunoensayo positivo" y "resultado de inmunoensayo positivo", que se utilizan de forma intercambiable dentro de esta solicitud, denota en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada como se usa en esta solicitud, que el inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada produce en una realización una señal relativa del 50% o más de dicha señal, en otra realización del 65% o más, en otra realización más del 80%, en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementada. El

término "inmunoensayo negativo" denota en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada como se usa en esta solicitud, que el inmunoensayo realizado con dicha muestra suplementada produce en una realización una señal relativa de menos del 50% de dicha señal, en otra realización de menos del 65% de dicha señal, en aún otra realización menos del 80% de dicha señal, en el caso del inmunoensayo realizado con dicha muestra no suplementada.

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

a) poner en contacto el anticuerpo de captura de fármaco conjugado a una fase sólida con dicha muestra no adicionada,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármaco conjugado a una fase sólida que se ha puesto en contacto con la muestra con el anticuerpo trazador de fármaco,

c) detectar el anticuerpo trazador de fármacos mediante la detección del marcador detectable conjugado con el anticuerpo trazador de fármaco.

Opcionalmente pueden ser incluidos pasos de lavado entre los pasos a) y b), y b) y c).

Se obtiene un "inmunoensayo positivo" y "resultado de inmunoensayo positivo" cuando

a) un anticuerpo anti-fármaco contenido en la muestra se une a la fase sólida por el anticuerpo de captura de fármacos,

b) el anticuerpo trazador de fármaco se une al complejo de a), y

c) el marcador detectable del anticuerpo trazador de fármaco se detecta ya sea directamente o con la ayuda de una pareja de unión adicional.

En el caso de un "inmunoensayo negativo" o "resultado de inmunoensayo negativo" uno o más de los criterios arriba mencionados no se cumplen.

En este documento se describe un método para distinguir en una muestra un anticuerpo anti-fármaco de un anticuerpo de fármaco anti-inflamatorio humanizado a partir de un anticuerpo anti-IgG humano, es decir, para distinguir un anticuerpo anti-fármaco específico de un anticuerpo anti-fármacos no específico, en el que el método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

a-i) un anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármaco en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

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

b-v) dicha muestra, a la que la inmunoglobulina G humana en forma oligomérica ha sido añadido antes del inmunoensayo,

c) determinar un anticuerpo anti-fármaco de un anticuerpo de fármaco anti-inflamatorio humanizado mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii), o determinar un anticuerpo presente en dicha muestra por ser un anticuerpo anti-IgG humano mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-ii) y b-iv) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v).

En este documento se describe un método para determinar si un anticuerpo anti-fármaco en una muestra está en forma monomérica u oligomérica, en donde el método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

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

a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra,

5 b-ii) dicha muestra, a la que dicho fármaco anticuerpo en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,
b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,

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

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

c) determinar si el anticuerpo anti-fármaco en la muestra está en forma monomérica mediante un inmunoensayo
positivo en bi) y b-ii) y b-IV) y un inmunoensayo negativa en b-iii) y b-v), o determinar si el anticuerpo anti-fármaco en
15 una muestra está en forma oligomérica mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-iii) y b-v) y un inmunoensayo
negativo en b-ii) y b-iv).

Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar la presencia de anticuerpos anti-fármacos
oligoméricos en una muestra, en donde el método comprende los siguientes pasos:

20 a) proporcionar

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

25 a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

b-i) dicha muestra,

30 b-ii) dicha muestra, a la que dicho fármaco anticuerpo en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,
b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,

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

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

c) determinar el anticuerpo anti-fármaco en una muestra sea de forma oligomérica mediante un inmunoensayo
positivo en bi) y b-ii) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-iii).

40 Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar la presencia de un anticuerpo anti-fármaco
monoméric en una muestra, en donde el método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

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

a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

50 b-i) dicha muestra,

b-ii) dicha muestra, a la que dijo anticuerpo de fármaco en forma monomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,

b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,

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

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

60 c) determinar el anticuerpo anti-fármaco en la muestra si está en forma monomérica mediante un inmunoensayo
positivo en bi) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).

Sorprendentemente, se ha encontrado que con la suplementación de dicha muestra con dicho anticuerpo de
fármacos en forma monomérica y oligomérica, así como con IgG humana en forma monomérica y oligomérica puede
65 obtenerse un patrón de resultados de ensayo a partir de los cuales se puede realizar la determinación de la clase de
los resultados, que se representa en el siguiente esquema:

	respuesta específica, monomérica	respuesta específica, oligomérica	respuesta no específica, oligomérica	respuesta no específica, monomérica
muestra bi)	+	+	+	+
b-ii)	-	+	+	-
b-iii)	-	-	-	-
b-iv)	+	+	+	-
b-v)	+	+	-	-

Por lo tanto, con el método de acuerdo con la invención se pueden clasificar las respuestas o resultados de inmunoensayo en monomérica y oligomérica así como específica y no específica.

5 Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para determinar un resultado positivo de una determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármacos en una muestra usando un inmunoensayo que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho método comprende los siguientes pasos:

- 10 a) proporcionar
- a-i) un anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,
- 15 b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos separado con
- b-i) dicha muestra,
b-ii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica se ha añadido antes del
20 inmunoensayo,
b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,
b-iv) dicha muestra, a la que la inmunoglobulina G humana en forma monomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,
25 b-v) dicha muestra, a la que la inmunoglobulina G humana en forma oligomérica se ha añadido antes del
inmunoensayo,
- c) determinar un resultado positivo de una determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármacos en una muestra usando un inmunoensayo mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-iii) y b-v) y un inmunoensayo
30 negativo en b-ii) y b-iv) .

Una realización de los aspectos de la presente invención es que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo puente de doble antígeno utilizando un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco. Otra forma de realización de los aspectos de la invención es que dicho anticuerpo es un anticuerpo de fármacos para el
35 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 osteoartritis. En otra realización dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo contra el receptor de IL-6, o contra el receptor de IGF-1, o del receptor alfa 1 de IL-13. Una forma de realización de los aspectos de la presente invención comprende que dicho anticuerpo de captura de fármacos es una mezcla de dicho anticuerpo de fármacos que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármacos que difieren en el sitio de anticuerpo en el que se conjugan a la fase sólida, y el anticuerpo trazador de fármaco es una mezcla de dicho anticuerpo de fármacos que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármacos que difieren en el sitio de anticuerpo en el que se conjugan con el marcador detectable. Una realización adicional es que la conjugación del anticuerpo de fármacos a su pareja de conjugación se realiza mediante unión química a través de N-terminal y / o grupos ε-amino (lisina), los grupos ε-amino de lisinas diferentes, grupos carboxi, sulfhidril-, hidroxilo y / o fenólicos funcionales de la cadena principal de aminoácidos del anticuerpo de fármacos y / o grupos alcohol de azúcar de la estructura de carbohidrato del anticuerpo de fármacos. En una forma de realización de aspectos de la invención, la mezcla de anticuerpos de captura de fármacos o mezcla de anticuerpos de trazador de fármacos comprende el anticuerpo conjugado de fármacos a través de un grupo amino y a través de una estructura de carbohidrato a su pareja de conjugación. En una realización adicional la conjugación del anticuerpo de captura de fármacos a la fase sólida se lleva a cabo por adsorción pasiva o a través de una pareja de unión específica. En una realización de la invención, la pareja de unión específica (primer componente / segundo componente) es estreptavidina o avidina / biotina, o anticuerpo / antígeno (ver, por ejemplo, Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996) o lectina / polisacárido, o esteroides / proteína de unión a esteroide, o receptor de la hormona / hormona o enzima / sustrato, o IgG / proteína A y / o proteína G. En una realización, el anticuerpo de captura de fármacos se conjuga con biotina y la conjugación con la fase sólida se lleva a cabo a través de avidina o estreptavidina inmovilizada. En
55 aún otra realización de los aspectos de la invención, el anticuerpo trazador de fármaco se conjuga con el marcador

detectable a través de una pareja de unión específica, en una realización, el anticuerpo trazador de fármaco se conjuga con digoxigenina y la unión al marcador detectable se realiza a través de un anticuerpo contra digoxigenina. En otra realización de los aspectos de la presente invención, la relación de anticuerpo de captura respecto el anticuerpo trazador de fármacos es de 1:10 a 50:1 (relación significa la proporción de moléculas de anticuerpos, independientemente de que el peso molecular de los conjugados pueda ser diferente).

En este documento se describe un método para determinar el tipo de una respuesta del sistema inmunológico a un anticuerpo de fármaco aplicado, especialmente un anticuerpo terapéutico. Con este método es posible distinguir si un anticuerpo anti-fármacos detectado es uno de los siguientes:

- i) un anticuerpo anti-fármaco específico, monomérico, o
- ii) un anticuerpo anti-fármaco específico, oligómero, o
- iii) un anticuerpo anti-IgG humano no específico, oligomérico, o
- iv) un anticuerpo anti-IgG humano no específico, monomérico, o
- v) un anticuerpo no específico.

Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para determinar el tipo de un anticuerpo para un anticuerpo de fármacos (anticuerpo anti-fármaco) presente en una muestra utilizando un inmunoensayo puente de doble antígeno que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármaco, mediante el cual el método comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar

- a-i) dicho anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
- a-ii) dicho anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,

b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con

- b-i) dicha muestra,
- b-ii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,
- b-iii) dicha muestra, a la que dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,
- b-iv) dicha muestra, a la que la inmunoglobulina G humana en forma monomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,
- b-v) dicha muestra, a la que la inmunoglobulina G humana en forma oligomérica se ha añadido antes del inmunoensayo,

c) determinar si un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti-fármaco específico, monomérico mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-ii) y b-IV) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v), o

determinar si un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti-fármaco específico, oligomérico mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-ii) y b-IV) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v), o

determinar si un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo anti-IgG humano no específico oligomérico mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-ii) y b-IV) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-iii) y b-v), o

determinar si un anticuerpo presente en dicha muestra es un anticuerpo no específico mediante un inmunoensayo positivo en bi) y b-ii) y b-iii) y b-iv) y b-v), o

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

Los siguientes ejemplos, referencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de la figura

Figura 1. Ensayo puente para la detección de anticuerpos anti-fármacos: El anticuerpo de fármacos biotinilado (Captura-BI) está unido a una placa de microtitulación revestida con estreptavidina (SA-MTP); el anticuerpo anti-fármaco tiende un puente sobre el anticuerpo de captura de fármacos (Captura- BI; BI = biotina) con anticuerpo trazador de fármaco marcado con digoxigenina (DIG-trazador; DIG = digoxigenilado); el complejo inmovilizado se detecta mediante anticuerpo policlonal anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante (DIG-pAb-POD); anticuerpo anti-fármacos policlonal de conejo (rpAb) se utiliza como estándar.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Biotinilación del anticuerpo mAb IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido D-biotinoil-aminocaproico

10 El anticuerpo contra el receptor de IL-6 (mAb IL-6R) se dializó frente a tampón (tampón fosfato de potasio 100 mM (en lo sucesivo indicado como K-PO₄), pH 8,5). Después, la solución se ajustó a una concentración de proteína de 10 mg / ml. Se disolvió éster de N-hidroxisuccinimida de ácido D-biotinoil-aminocaproico en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:5. Después de 60 minutos se detuvo la reacción mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo de marcaje se eliminó por diálisis frente K-PO₄ 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Ejemplo 2

15 Biotinilación de mAb IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido D-biotinoil-aminocaproico después del tratamiento con anhídrido de ácido citracónico

20 MAb IL-6R se dializó frente a 100 mM de K-PO₄, pH 8,4. Después, la solución se ajustó a una concentración de proteína de 20 mg / ml. Se disolvió anhídrido de ácido citracónico en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:5. Después de 120 minutos se detuvo la reacción por cromatografía en una columna con Sephadex® G25 equilibrada con 100 mM de K-PO₄, pH 8,4. La solución de anticuerpo se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 4 mg / ml. Se disolvió éster de N-hidroxisuccinimida de ácido-D-biotinoil-aminocaproico en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:5. La reacción se detuvo después de 60 minutos mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo de marcaje se eliminó por diálisis frente a 200 mM de tampón de acetato de sodio, pH 5,0. La solución de anticuerpos se transfirió a una solución de K-PO₄ 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,2, mediante cromatografía en una columna con Sephadex® G25.

30 Ejemplo 3

Biotinilación de mAb IL-6R con hidrazida de biotina

35 MAb IL-6R se dializó frente a tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 5,5. Después, la solución se ajustó a una concentración de proteína de 20 mg / ml. Se disolvió peryodato de sodio en tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 5,5, y se añadió a la solución de anticuerpo a una concentración final de 10 mM. La reacción se detuvo después de 30 minutos mediante cromatografía sobre una columna de Sephadex® G25 equilibrada con tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 5,5. La solución de anticuerpo se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 5 mg / ml. La hidrazida de biotina se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:50. La reacción se detuvo después de 120 minutos mediante la adición de borohidruro de sodio a una concentración final de 15 mM. Después de 30 minutos la solución de anticuerpo se dializó frente a una solución de K-PO₄ 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,2

Ejemplo 4

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

50 MAb IL-6R se dializó frente a tampón de Digoxigenación (100 mM K-PO₄, pH 8,5). Después, la solución se ajustó a una concentración de proteína de 10 mg / ml. éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenina 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:5. Después de 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo de marcaje se eliminó por diálisis frente a K-PO₄ 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

55 Ejemplo 5

Digoxigenación de mAb IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido digoxigenina 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico después del tratamiento con anhídrido de ácido citracónico

60 MAb IL-6R se dializó frente a 100 mM de K-PO₄, pH 8,4. Después, la solución se ajustó a una concentración de proteína de 20 mg / ml. Anhídrido de ácido citracónico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:5. La reacción se detuvo después de 120 minutos por cromatografía en una columna con Sephadex® G25 equilibrada con 100 mM de K-PO₄, pH 8,4. La solución de anticuerpo se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 4 mg / ml. Éster de N-hidroxisuccinimida de ácido digoxigenina 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:5. La reacción se detuvo después de 60 minutos mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo de marcaje se

eliminó por diálisis frente a 200 mM de tampón de acetato de sodio, pH 5,0. La solución de anticuerpos se transfirió a un tampón con 25 mM de K-PO₄ y NaCl 150 mM, pH 7,2, mediante cromatografía en una columna con Sephadex® G25.

5 Ejemplo 6

Digoxigenación de mAb IL-6R con digoxigenina-X-hidrazida

10 MAb IL-6R se dializó frente a 100 mM de tampón de acetato de sodio, pH 5,5. Después, la solución se ajustó a una concentración de proteína de 20 mg / ml. Peryodato de sodio se disolvió en 100 mM de tampón de acetato de sodio, pH 5,5, y se añadió a la solución de anticuerpo a una concentración final de 10 mM. La reacción se detuvo después de 30 minutos por cromatografía sobre una columna de Sephadex® G25 equilibrada con tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 5,5. La solución de anticuerpo se ajustó a una concentración de proteína de aproximadamente 5 mg / ml. Digoxigenina-X-hidrazida se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una relación molar de 1:50. Después de 120 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de borohidruro de sodio a una concentración final de 15 mM. Después de 30 minutos la solución de anticuerpo se dializó frente K-PO₄ 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,2

20 Ejemplo 7

a) Generación de anticuerpos de fármacos en forma oligomérica

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

30 Disuccinimidilsuberato (DSS) se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:7 (IgG: DSS). La mezcla se incubó a 25 °C y pH 8,4 con agitación y la reacción se analizó con una cromatografía analítica de filtración en gel (por ejemplo, utilizando una columna TSK 4000). La polimerización se detuvo generalmente después de 60 min. mediante la adición de lisina a una concentración final de 10 mM. Después de 45 min. de incubación a 25 °C el anticuerpo de fármaco polimerizado se separó por filtración en gel (por ejemplo, usando una columna de Sephacryl S400) para eliminar las fracciones de bajo peso molecular.

35 b) Generación de IgG humana en forma oligomérica

40 Se dializó IgG humana purificada a partir de suero humano por cromatografía de intercambio iónico frente tampón de fosfato de potasio 150 mM que contiene NaCl 100 mM, pH 8,4, y la solución de proteína se concentró a una concentración de proteína de 75 mg / ml. Disuccinimidilsuberato (DSS) se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5 (IgG: DSS). La mezcla se incubó a 25 °C y pH 8,4 con agitación y la reacción se analizó con una columna de filtración en gel analítica (por ejemplo, usando una columna TSK 4000). La polimerización se detuvo generalmente después de 60 min. mediante la adición de lisina a una concentración final de 10 mM. Después de 45 min de incubación a 25 °C la IgG oligomérica humana se separó por filtración en gel (por ejemplo, usando una columna de Sephacryl S400) para eliminar las fracciones de bajo peso molecular.

45 Ejemplo 8

Fundamento del ensayo

50 El ELISA utiliza anticuerpo de fármaco inmovilizado (Captura-BI) en placas de microtitulación con estreptavidina (SA-MTP) para la captura de la muestra que contiene anticuerpos anti-fármacos (ADA). Los ADA capturados se detectan mediante los anticuerpos de fármacos digoxigenados (trazador-DIG). El complejo unido de ADA y de trazadores-DIG se detecta mediante un anticuerpo policlonal anti-DIG conjugado con peroxidasa que reacciona con su sustrato ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y la posterior lectura fotométrica. La densidad óptica (DO) se mide a 405 nm (con 490 nm de longitud de onda de referencia). Para la determinación de una curva estándar de la muestra se sustituye por una solución de un anticuerpo anti-fármaco a una concentración definida. La concentración estándar más alta debe alcanzar un valor de DO de 1,8 a 2,2 UA.

60 En el primer paso, todas las muestras fueron seleccionadas por ser positivas o negativas para anticuerpos anti-fármacos (ADA) (ensayo de detección; respuesta sí / no) analizando todas las muestras a una dilución de 1:20. El punto de corte positivo / negativo se determinó en el intervalo de confianza del 95% utilizando la respuesta del ensayo, es decir, la densidad óptica (DO) de múltiples análisis de muestras de suero en blanco.

65 En un segundo paso, todas las muestras positivas se analizaron de nuevo utilizando como máximo cuatro pasos distintivos adicionales para caracterizar la respuesta (por ejemplo, especificidad de fármaco):

- i) muestra no adicionada
- ii) muestra adicionada con 1 µg / ml de anticuerpo de fármacos en forma monomérica
- iii) muestra adicionada con 1 µg / ml de anticuerpo de fármacos en forma oligomérica
- iv) muestra adicionada con 1 µg / ml de anticuerpo de fármacos en forma monomérica
- v) muestra adicionada con 1 µg / ml de anticuerpo de fármacos en forma oligomérica

En los pasos distintivos que el ELISA se realizó de nuevo como se describió anteriormente (ensayo de selección), pero la muestra fue anterior a la aplicación a la placa microtitulada incubada con cada una de las soluciones ii) a v) como se describió anteriormente para los cuatro pasos distintivos. Las sustancias adicionadas compiten con la captura-BI para la unión a sustancias (por ejemplo ADA) de la muestra. La señal de ensayo de la muestra no adicionada tiene que estar dentro del intervalo dinámico del ensayo, de lo contrario la muestra tiene que ser diluida. Esta dilución final de la muestra tiene que utilizarse también en todos los pasos distintivos. Si la disminución en la absorbancia debido a la presencia de reactivos adicionados (ii) - v)) es inferior al 20%, el resultado de la prueba se consideró "positivo" (inmunoensayo positivo). Si la disminución en la absorbancia fue de 20% o más, el resultado de la prueba se consideró "negativo" (inmunoensayo negativo). Con otras palabras, si la recuperación de la señal era más del 80%, el resultado de la prueba se consideró "positivo" (inmunoensayo positivo) y si la recuperación de la señal era menos de 80%, el resultado de la prueba se consideró "negativo" (inmunoensayo negativo).

Ejemplo 9

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

El ensayo se realizó de acuerdo con el Ejemplo 8. Excepción: la muestra (adicionada o no adicionada) se preincubó con el fármaco-DIG durante una hora. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de la prueba ELISA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpo anti-IL-6R

	anticuerpo de fármaco inespecífico, oligomérico	anticuerpo de fármaco respuesta inespecífica	anticuerpo de fármaco inespecífico, oligomérico	anticuerpo de fármaco específico, monomérico	anticuerpo de fármaco específico, monomérico	anticuerpo de fármaco inespecífico, monomérico
muestra no adicionada	+	+	+	+	+	+
señal recuperada en la adición	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
ii) anticuerpo anti-IL-6R en monomérico	96,5 +	95,1 +	93,2 +	27,9 -	2,88 -	63,3 -
iii) anticuerpo anti-IL-6R en oligomérico	41,1 -	92,0 +	12,2 -	15,3 -	BLQ -	12,1 -
iv) anticuerpos anti-IgG humano	91,9 +	103,9 +	88,9 +	90,8 +	107,0 +	73,0 -
v) anticuerpos anti-IgG humano oligomérico	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 anti-IGF-1R

El ensayo se realizó de acuerdo con el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.

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

	anticuerpo de fármaco respuesta inespecífica	anticuerpo de fármaco respuesta específica, oligomérico (IgM)	anticuerpo de fármaco respuesta específica, monomérico (IgG)
muestra no adicionada	+	+	+
señal recuperada en la	[%]	[%]	[%]

adición			
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 anti-IgG humano en forma monomérica	109,1 +	94,4 +	95,2 +
v) anticuerpo anti-IgG humano en forma oligomérica	111,2 +	96,1 +	97,4 +

Ejemplo 11 ECLIA para la detección de anticuerpos anti-anticuerpo anti-IL-13R

5 El ensayo se realizó de acuerdo con el Ejemplo 8. Excepción: este es un ensayo que usa electroquimioluminiscencia como método de detección. Esto significa que un anticuerpo de fármaco marcado con rutenio se utilizó como trazador-DIG en lugar de anticuerpo de fármacos digoxigenados y anticuerpo anti-DIG conjugado con peroxidasa. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3.

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

	anticuerpo de fármaco respuesta inespecífica monomérico	anticuerpo de fármaco respuesta inespecífica, monomérico	anticuerpo de fármaco respuesta específica, monomérico
muestra no adicionada	+	+	+
señal recuperada	[%]	[%]	[%]
b-ii) anticuerpo anti-IL-13Ra1 en forma monomérica	3,96 -	10,87 -	0,08 -
b-iii) anticuerpo anti-IL-13Ra1 en forma oligomérica	BLQ -	BLQ -	0,20 -
b-iv) anticuerpo anti-IgG humano en forma monomérica	BLQ -	0,61 -	90,84 +
b-v) anticuerpo anti-IgG humano en forma oligomérica	BLQ -	BLQ -	85,35 +
BLQ = por debajo del límite de cuantificación			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la determinación de un anticuerpo contra un anticuerpo de fármaco (anticuerpo anti-fármaco, ADA) en una muestra con un inmunoensayo, en el que dicho método comprende los siguientes pasos:
- a) proporcionar
- 10 a-i) un anticuerpo de captura de fármacos, en el que dicho anticuerpo de fármaco está conjugado a una fase sólida,
a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho anticuerpo de fármaco está conjugado a un marcador detectable,
- b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con
- 15 b-i) dicha muestra,
b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármaco en forma monomérica,
b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica,
- c) determinar un anticuerpo contra dicho anticuerpo de fármacos en dicha muestra mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).
- 20 2. Un método para determinar la presencia de anticuerpos anti-fármacos oligoméricos en una muestra con un inmunoensayo, en el que el método comprende los siguientes pasos:
- a) proporcionar
- 25 a-i) un anticuerpo de captura de fármacos, en el que dicho anticuerpo de fármacos está conjugado a una fase sólida,
a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, en el que dicho anticuerpo de fármaco está conjugado a un marcador detectable,
- 30 b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con
- b-i) dicha muestra,
b-ii) dicha muestra, a la que ha sido añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica,
b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica,
35 b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido la inmunoglobulina G humana en forma monomérica,
b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido la inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,
- c) determinar el anticuerpo anti-fármaco en una muestra sea de forma oligomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-ii) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativa en b-iii).
- 40 3. Un método para determinar la presencia de anticuerpos anti-fármacos monoméricos en una muestra con un inmunoensayo, en el que el método comprende los siguientes pasos:
- a) proporcionar
- 45 a-i) un anticuerpo de captura de fármacos, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a una fase sólida,
a-ii) un anticuerpo trazador de fármaco, que es dicho anticuerpo de fármaco conjugado a un marcador detectable,
- b) poner en contacto dicho anticuerpo de captura de fármacos por separado con
- 50 b-i) dicha muestra,
b-ii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma monomérica,
b-iii) dicha muestra, a la que se ha añadido dicho anticuerpo de fármacos en forma oligomérica,
b-iv) dicha muestra, a la que se ha añadido la inmunoglobulina G humana en forma monomérica,
55 b-v) dicha muestra, a la que se ha añadido la inmunoglobulina G humana en forma oligomérica,
- c) determinar si el anticuerpo anti-fármaco en la muestra está en forma monomérica mediante un inmunoensayo positivo en b-i) y b-iv) y b-v) y un inmunoensayo negativo en b-ii) y b-iii).
- 60 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho inmunoensayo es un inmunoensayo puente de doble antígeno que comprende un anticuerpo de captura de fármacos y un anticuerpo trazador de fármacos.
- 65 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo de fármacos para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo para el tratamiento de la artritis reumatoide o la osteoartritis.
- 5 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria es un anticuerpo contra el receptor de IL-6, o contra el receptor de IGF-1, o contra el receptor alfa 1 de IL-13.
- 10 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo de captura de fármacos es una mezcla de dicho anticuerpo de fármacos que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármacos que difieren en el sitio de anticuerpo en el que se conjugan a la fase sólida, y el anticuerpo trazador de fármaco es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármacos que difieren en el sitio de anticuerpo en el que se conjugan con el marcador detectable.
- 15 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la mezcla de anticuerpos de captura de fármacos o la mezcla de anticuerpos trazadores de fármacos comprende un anticuerpo conjugado de fármacos conjugado a través de un grupo amino y un anticuerpo de fármacos conjugado a través de una estructura de hidratos de carbono a su pareja de conjugación.
- 20 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el anticuerpo de captura de fármacos está conjugado a biotina y la conjugación a la fase sólida se lleva a cabo a través de avidina o estreptavidina inmovilizada.
- 25 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el anticuerpo trazador de fármaco se conjuga con el marcador detectable a través de una pareja de unión específica.
12. Un método de acuerdo con reivindicación 11, caracterizado porque el anticuerpo trazador de fármaco se conjuga con digoxigenina y la unión al marcador detectable se realiza mediante un anticuerpo contra digoxigenina.
- 30 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proporción anticuerpo de captura de fármaco frente al anticuerpo trazador de fármaco está entre 1:10 y 50:1.

Fig.1

