

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 581**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2014** **PCT/EP2014/077897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15091438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2014** **E 14824416 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 3084439**

54 Título: **Análisis de anticuerpos**

30 Prioridad:

20.12.2013 US 201361919156 P
02.07.2014 US 201462019945 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2019

73 Titular/es:

PHADIA AB (100.0%)
Box 6460
751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

MOVÉRARE, ROBERT;
ERIKSSON, CAMILLA y
VENEMALM, LENNART

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 699 581 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

Análisis de anticuerpos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo del análisis bioquímico, y más específicamente a un procedimiento útil en el contexto de los productos biofarmacéuticos.

10 Antecedentes

La biofarmacia es el estudio de fármacos médicos producidos usando biotecnología. La primera de tales sustancias aprobada para uso terapéutico fue la insulina biosintética preparada mediante tecnología de ADN recombinante. El foco principal de atención después de la insulina fue encontrar otros productos rentables potenciales en la industria farmacéutica, tales como otras proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales. La terapia de anticuerpos monoclonales incluye el uso de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a células diana en un paciente, estimulando entonces al sistema inmunitario para atacar a esas células, por ejemplo en el tratamiento del cáncer. Es posible crear un anticuerpo monoclonal específico de casi cualquier diana extracelular o de superficie celular. Por tanto, se está acometiendo actualmente un gran volumen de investigación y desarrollo para crear anticuerpos monoclonales para numerosas enfermedades graves. Un ejemplo específico es en el tratamiento de artritis reumatoide, donde los anticuerpos monoclonales suprimen la respuesta al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que es parte de la respuesta inflamatoria. Se encuentra otro ejemplo en el tratamiento de esclerosis múltiple, donde se generan anticuerpos monoclonales contra ciertas integrinas en leucocitos, con lo que se posibilita la prevención de la infiltración leucocítica a través de la barrera hematoencefálica.

Sin embargo, no todos los pacientes responden como se espera a los fármacos biológicos. La formación de anticuerpos endógenos contra fármacos biológicos, los llamados anticuerpos antifármaco (ADA) es un problema importante; como tales, los ADA pueden neutralizar la acción del fármaco e incluso dar como resultado reacciones adversas. Por tanto, la monitorización de ADA se ha considerado importante tanto desde el punto de vista médico como por razones de economía sanitaria. En consecuencia, el análisis de la formación de ADA se ha vuelto una parte importante del desarrollo de nuevos fármacos biológicos e incluso un requisito para los organismos reguladores.

Se han descrito diversos formatos de ensayo para el análisis de ADA. Incluyen ensayos basados en células para el análisis de anticuerpos neutralizantes de fármaco (NAb) y procedimientos cromatográficos y la técnica de resonancia de plasmón de superficie para el análisis de anticuerpos de unión a fármaco (BAb). Sin embargo, los más usados son diferentes variantes de inmunoensayos para cribado de alto rendimiento y análisis de ADA de un modo conveniente y efectivo.

En términos generales, los inmunoensayos descritos para el análisis de ADA son ensayos de puente, donde se utiliza la multivalencia del ADA para complejar fármacos biológicos en solución y/o enlazar con una fase sólida; ensayos inmunosorbentes de anticuerpo de tipo sándwich, por ejemplo ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISA), que están basados en fármacos biológicos unidos a una fase sólida a la que se permiten unir ADA y después detectarse; y ensayos de anticuerpo inversos, también conocidos como ELISA indirecta o RIA en fase fluida, donde se permiten unir todas las inmunoglobulinas de isotipos seleccionados, independientemente de su especificidad de antígeno, a una fase sólida por un reactivo de captación, tal como un anticuerpo específico de isotipo o proteína A o proteína G, y en que los ADA se detectan más tarde por su capacidad de unión a fármaco.

Se ha mostrado que los anticuerpos IgG4 son de importancia específica para analizar separadamente en pacientes que reciben fármacos biológicos. Están disponibles productos comerciales para medidas clínicas de anticuerpos IgG4, tales como ImmunoCAP™ Specific IgG4 (disponible en www.phadia.com) que se usa extensamente en estudios clínicos de enfermedad alérgica.

El factor reumatoide (FR) es el nombre de autoanticuerpos definidos como anticuerpos contra la porción Fc de IgG humana. El FR se evalúa a menudo en pacientes sospechosos de tener cualquier forma de artritis y es parte de los criterios de enfermedad habituales de artritis reumatoide. Aunque el isotipo de FR es habitualmente IgM, se ha descrito cualquier isotipo de inmunoglobulinas, incluyendo IgG.

El documento WO 2009/077127 (F. Hoffmann-La Roche AG) se refiere a un ensayo diferenciador, donde se determina un anticuerpo contra un anticuerpo de fármaco en una muestra usando un inmunoensayo que comprende

un anticuerpo de fármaco de captura, que es el anticuerpo de fármaco conjugado con una fase sólida, y un anticuerpo de fármaco trazador, que es el anticuerpo de fármaco conjugado con un marcaje detectable. Se pone en contacto el anticuerpo de fármaco de captura separadamente con (i) la muestra; (ii) la muestra a la que se ha añadido el anticuerpo de fármaco en forma monomérica y (iii) la muestra a la que se ha añadido el anticuerpo de fármaco en forma oligomérica. Se realiza la determinación del anticuerpo contra el anticuerpo de fármaco mediante un inmunoensayo positivo en (i), e inmunoensayo negativo en (ii) y (iii).

El fondo del ensayo es bien conocido por causar problemas en cualquier desarrollo de inmunoensayo. En ensayos inmunosorbentes para el análisis de anticuerpos, la interferencia de la inmunoglobulina total puede generar resultados falsos positivos y baja sensibilidad, ya que los anticuerpos específicos de antígeno están habitualmente presentes como una fracción pequeña de la inmunoglobulina total en una muestra. Debido a la alta concentración de IgG en suero y plasma, la interferencia de IgG es un problema que aparece frecuentemente en ensayos inmunosorbentes de anticuerpo IgG. Otro problema de interferencia está causado por interacciones entre los fragmentos cristalizables (fragmentos Fc) de anticuerpos, por ello conocidos como interacciones Fc-Fc. Por ejemplo, en un ensayo inmunosorbente que orienta ADA de isotipo IgG4, puede aparecer interacción Fc-Fc entre IgG4 y otras moléculas de IgG usadas como antígeno enlazado con una fase sólida, por ejemplo anticuerpos IgG terapéuticos.

Un modo de superar la interacción Fc-Fc en ensayos inmunosorbentes de anticuerpos es simplemente evitar tener fragmentos Fc, y en lugar de ello usar fragmentos F(ab')₂ escindidos por enzima purificados o fragmentos Fab de moléculas de IgG como antígeno enlazado con la fase sólida. Como alternativa, en lugar de usar el formato de ensayos inmunosorbentes de anticuerpo, podrían usarse ensayos de anticuerpo inversos donde toda la IgG4 de la muestra se une por reactivos específicos de IgG4 enlazados con una fase sólida, tras de lo cual se añade IgG entera marcada o fragmentos de la misma como agente o reactivo de detección.

El documento WO 2012/02774 (Roche Diagnostics GmbH) se refiere a un ensayo para la medida de la unión de anticuerpos a un anticuerpo monoclonal terapéutico, donde se incuban fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales terapéuticos unidos a una superficie con la muestra que comprende anticuerpos contra el anticuerpo monoclonal terapéutico.

Rispens et al (Rispens T, Ooievaar-De HP, Vermeulen E, Schuurman J, van der Neut KM, Aalberse RC. Human IgG4 binds to IgG4 and conformationally altered IgG1 via Fc-Fc interactions. J Immunol 2009; 182: 4275-81) han investigado los aspectos fisicoquímicos de las interacciones Fc-Fc y discuten las posibles implicaciones desde un punto de vista biológico y médico.

Lundkvist M et al: "Characterization of anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis patients", MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL, Vol. 19, nº 6, mayo de 2013 (2013-05), páginas 757-764, XP008175740 divulga un inmunoensayo en sándwich para ADA de isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e IgM que comprende recubrir una placa con el fármaco natalizumab, añadir muestra y ponerla en contacto con anticuerpos específicos de isotipo marcados.

Por tanto, existe la necesidad en este campo de formatos de ensayo novedosos con los que pueda reducirse la unión inespecífica causada, p.ej., por interacciones Fc-Fc.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento como se define en la reivindicación independiente 1 y a usos como se definen en las reivindicaciones independientes 11 y 12.

Aparecerán otras realizaciones, ventajas y detalles a partir de las reivindicaciones dependientes y de la descripción detallada que sigue después.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una figura esquemática que muestra el principio de un formato conocido de un ensayo inmunosorbente de unión a anticuerpo para ADA.

La Figura 2 es una figura esquemática que ilustra el problema de los fondos aumentados en un ensayo inmunosorbente de anticuerpo IgG4 debido a la interacción Fc-Fc.

La Figura 3 es una figura esquemática que muestra cómo puede usarse un ligador según la invención para desplazar la molécula de IgG de la proximidad de la fase sólida en un ensayo inmunosorbente de anticuerpo IgG4.

La Figura 4 es una figura esquemática que muestra cómo puede usarse una diana de anticuerpo como ligador según la invención para desplazar la molécula de IgG de la proximidad de la fase sólida en un ensayo inmunosorbente de

anticuerpo IgG4.

La Figura 5 muestra cuatro muestras negativas de ADA, diluyente de ensayo y una muestra positiva de ADA ensayados según técnicas convencionales, como se describe en la parte experimental siguiente.

- La Figura 6 muestra siete muestras de suero definidas como positivas de ADA para infliximab usando otros ensayos (las primeras siete barras que aparecen desde la izquierda), siete muestras definidas como negativas de ADA (las siguientes siete barras) y diluyente de ensayo (la última barra) con análisis de anticuerpos IgG4 de infliximab usando el ensayo ImmunoCAP™ Specific IgG4.

Definiciones

- El término “molécula de IgG” significa en la presente memoria cualquier molécula que comprenda al menos una región Fc, o al menos un dominio constante capaz de causar unión inespecífica de una inmunoglobulina.

- La frase “capaz de unión” como se usa en la presente memoria debería entenderse en su sentido más amplio, es decir, como capaz de participar en la unión o capaz de unirse. Por ejemplo, la frase “una molécula capaz de unirse a un anticuerpo” incluye en la presente memoria que un anticuerpo se una a dicha molécula.

- El término “producto biofarmacéutico” se usa intercambiamente con “fármacos biológicos” que pueden estar basados en anticuerpos también conocidos como anticuerpos terapéuticos e incluye, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales de ratón completos tales como muromonab-CD3 y tositumomab, anticuerpos monoclonales quiméricos humanos/de ratón tales como infliximab y cetuximab, anticuerpos monoclonales humanizados tales como natalizumab y omalizumab, anticuerpos monoclonales completamente humanos tales como adalimumab y golimumab; regiones de unión a diana de anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión compuestas por partes de anticuerpos tales como regiones Fc y otras moléculas tales como receptores de citocina, p. ej. etanercept.

- El término “anticuerpo antifármaco” o ADA se explicó en líneas generales en los “Antecedentes” anteriores, y se usa en la presente memoria en ese sentido amplio. Por tanto, puede provocarse un ADA contra un fármaco que comprende una o más partes o dominios de un anticuerpo, tal como una o más cadenas gamma de Fc de inmunoglobulina. Como alternativa, un anticuerpo de “fármaco de IgG” contra un ADA como se usa en la presente memoria puede ser, o comprender, una proteína de fusión donde están presentes una parte o partes de uno o más anticuerpos y/o antígenos.

- En la presente solicitud, los términos “provocado” y “dirigido” se usan intercambiamente con relación a anticuerpos para describir a cuál molécula o compuesto está dirigido el anticuerpo y contra el que es específico.

Descripción detallada de la invención

- En un primer aspecto, la presente invención es un procedimiento como se define en la reivindicación independiente 1.

- Los anticuerpos formados endógenamente están dirigidos contra IgG. Además, los anticuerpos formados endógenamente son ADA, pudiendo ser ADA contra una proteína recombinante, una proteína de fusión o un fragmento de proteína, obtenidos por formación endógena en un paciente que recibe tratamiento con un fármaco biológico o *in vitro*. El ADA puede ser también uno o más anticuerpos preexistentes en un paciente que no recibe tratamiento con un fármaco biológico.

- Como apreciará el especialista en la materia, la clase de ADA dependerá de la naturaleza del fármaco biológico o producto biofarmacéutico contra el que se haya provocado, así como de la formulación y administración del fármaco. En una realización específica, los ADA son contra un grupo común de productos biofarmacéuticos, tales como un fármaco de IgG, p. ej. IgG1.

Como apreciará el especialista en la materia, el ADA puede ser un anticuerpo de cualquier isotipo, tal como inmunoglobulina A, D, E, G o M. En el procedimiento de la invención, se analizan ADA de isotipo IgG4.

- Como alternativa, se analizan anticuerpos contra sustancias distintas de productos biofarmacéuticos. Por tanto, en esta realización los anticuerpos formados endógenamente son el llamado FR, que es relevante en artritis reumatoide.

- Como se desprende de lo anterior, es un aspecto de la invención el uso del procedimiento reivindicado en el contexto de productos biofarmacéuticos. Por tanto, la molécula capaz de unión a una molécula de anticuerpo

formado endógenamente puede ser un anticuerpo de IgG terapéutico. La IgG es ventajosamente humana, pero puede ser de otro origen, tal como de ratón o similar. En una realización, la molécula de IgG es un anticuerpo monoclonal, y en una realización alternativa, la molécula de IgG es un anticuerpo policlonal.

- 5 Las moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente son moléculas de IgG. En una realización, las moléculas capaces de unión a dichos anticuerpos formados endógenamente se seleccionan del grupo consistente en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

- En una realización, las moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente son anticuerpos
10 completos tales como IgG completa. En un aspecto divulgado alternativo, las moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente son fragmentos de anticuerpos, tales como una o más regiones Fc de un anticuerpo tal como IgG. En un aspecto divulgado específico, las moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente son uno o más dominios constantes, tales como uno o más dominios constantes de IgG.
- 15 Los presentes inventores han mostrado que el enlazamiento de las moléculas capaces de unión a dicho anticuerpos formados endógenamente con una fase sólida a través de un ligador puede reducir la unión inespecífica como se causa a menudo por interacciones Fc-Fc en un inmunoensayo. El distanciamiento de dichas moléculas capaces de unión a dichos anticuerpos formados endógenamente de la proximidad de la fase sólida reduce la extensión de cambios inducidos por la fase sólida de la estructura de la molécula enlazada con IgG tales que facilitan las
20 interacciones Fc-Fc indeseadas anteriormente discutidas.

- El ligador usado en el presente procedimiento puede ser cualquier entidad que consiga este fin, tal como una molécula orgánica, un aminoácido, un péptido, una proteína o molécula de origen proteico, un monosacárido, un oligosacárido o un polisacárido. Puede ser un ligador sintético, tal como poli-L-lisina, un dendrímero, un oligómero de
25 etilenglicol, un polímero de etilenglicol o una proteína tal como seroalbúmina humana. Como alternativa, el ligador puede ser cualquier otra molécula que posibilite la reducción ventajosa y/o incluso la eliminación de interferencias proporcionada por la presente invención como se describe con más detalle en otro lugar de la presente solicitud. Por tanto, en una realización, el ligador es una molécula orgánica, un aminoácido, un péptido, una proteína o una molécula de origen proteico, un monosacárido, un oligosacárido o un polisacárido.
- 30 En una realización, el ligador puede proporcionarse como parte de la fase sólida, y se conjugan entonces la IgG u otras moléculas con la fase sólida. Por tanto, las moléculas pendientes de la fase sólida actuarán como ligadores proporcionando el efecto ventajoso según la invención.

- 35 Por tanto, en una realización del presente procedimiento, el ligador se forma por el acoplamiento covalente de moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente con moléculas que se extienden desde una fase sólida compuesta por polímero natural, tal como celulosa.

- El especialista en la materia puede diseñar un ensayo útil en el procedimiento según la invención construyendo
40 específicamente o eligiendo un ligador que proporcione ciertas ventajas deseadas. Por tanto, en una realización, la molécula o moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente es al menos un anticuerpo con especificidad conocida y el ligador es su ligando diana.

- El ligador usado en el presente procedimiento puede proporcionarse usando el bien conocido sistema de
45 acoplamiento de estreptavidina/biotina, y más específicamente enlazando la biotina con la molécula de IgG siguiendo procedimientos bien conocidos, y enlazando la estreptavidina con la fase sólida por adsorción, como se usa comúnmente en ELISA, o por acoplamiento covalente, como se usa comúnmente en pruebas de ImmunoCAP™. Por tanto, la molécula de estreptavidina actuará aquí como ligador que se une a la molécula de IgG marcada con biotina y sitúa la molécula de IgG fuera de la proximidad de la fase sólida, lo que se ha mostrado según la invención
50 que proporciona ventajas inesperadas en términos de interferencia reducida, especialmente un nivel reducido de interacciones Fc-Fc indeseadas. Por consiguiente, en una realización específica del presente procedimiento, la molécula o moléculas capaces de unirse a anticuerpos formados endógenamente se han marcado con biotina y el ligador es estreptavidina.

- 55 La tecnología para preparar proteínas de fusión que incluyen dos o más elementos de diferentes proteínas, o diferentes partes de proteínas, es bien conocida y se emplea comúnmente en este campo. Según la presente invención, puede construirse una proteína de fusión para incluir elementos que sean útiles en el presente procedimiento.

- 60 Por tanto, en una realización, la molécula o moléculas capaces de unión a anticuerpos formados endógenamente es

al menos una proteína de fusión entre una molécula de unión a ligando y la región Fc de una molécula de IgG, y el ligador es su ligando diana.

En una realización del presente procedimiento, el anticuerpo específico de IgG4 marcado capaz de unión a los anticuerpos formados endógenamente es un anticuerpo monoclonal o policlonal.

El anticuerpo endógeno analizado según la presente invención puede haberse provocado en un individuo que recibe terapia usando un fármaco biológico, tal como un anticuerpo terapéutico. Por tanto, en una realización, la solución es una muestra biológica tal como sangre. La presente innovación describe un nuevo principio o procedimiento que es útil en los análisis de anticuerpos, a saber moléculas de IgG4. Por lo tanto, puede usarse un ensayo inmmunosorbente de anticuerpo según la invención para tomar decisiones clínicas para el cuidado de pacientes así como para el uso en el desarrollo de nuevos fármacos biológicos.

En consecuencia, en una realización, la presente invención se refiere al uso de un procedimiento según la invención para monitorizar la respuesta de anticuerpo de un paciente ante un anticuerpo terapéutico.

Como alternativa, como se indica anteriormente, el anticuerpo formado endógenamente puede ser FR. Por consiguiente, el procedimiento según la invención puede usarse para evaluar pacientes sospechosos de tener cualquier forma de artritis en diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades.

La presente invención puede usarse en un ensayo inmunitario como se describe anteriormente en el desarrollo de fármacos.

La invención puede usarse para analizar la presencia de FR en una muestra de paciente.

La invención puede usarse en cualquiera de los siguientes formatos: un ensayo de tipo sándwich (la invención reivindicada usa un formato de sándwich) tal como un radioinmunoensayo (RIA), enzoinmunoensayo (EIA), ensayo de inmmunosorción ligada a enzima (ELISA), inmunoensayo de luminiscencia (LIA) o ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL); un ensayo multiplexado tal como un ensayo basado en multimatrices o un ensayo basado en partículas; un ensayo basado en flujo lateral, p. ej. para uso en el lugar de atención; un ensayo de proximidad; un ensayo de aglutinación; un ensayo turbidimétrico o un ensayo nefelométrico.

El formato de ECL puede ser adecuado ya que puede omitir la etapa o etapas de lavado. El kit puede diseñarse para análisis de ADA o FR en un sistema que permita la detección/medida simultánea de más de un analito.

Es un aspecto del kit una prueba de lugar de atención (POC) basada en una membrana microporosa impulsada por capilares, tal como una membrana de nitrocelulosa, para el análisis de ADA o FR usando el procedimiento descrito anteriormente.

Es otro aspecto del kit para inmunoensayo de proximidad, donde el fármaco se enlaza con un tipo de fase sólida tal como perlas, denominadas perlas donantes, y el reactivo de detección se enlaza con otro tipo de fase sólida tal como perlas, denominadas perlas aceptoras. Por tanto, tal kit comprende perlas donantes, perlas aceptoras y medios para generar una señal cuando las perlas se complejan por el analito. Es una ventaja de este formato que pueden omitirse las etapas de lavado.

El kit según la divulgación puede incluir instrucciones escritas para su uso para detectar ADA o FR; un número adecuado de envases apropiadamente dimensionados; disolventes; reactivos y similares.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 es una figura esquemática que muestra el principio de un ensayo inmmunosorbente de unión a anticuerpo, también conocido como ELISA en fase sólida, para anticuerpos antifármaco (ADA).

La Figura 2 es una figura esquemática que ilustra el problema de los fondos aumentados en un ensayo inmmunosorbente de anticuerpo IgG4 debido a la interacción Fc-Fc entre una molécula de IgG, que puede ser un anticuerpo terapéutico de isotipo IgG1, en estrecha proximidad a la fase sólida, e IgG4 en una muestra negativa de ADA.

La Figura 3 es una figura esquemática que muestra cómo puede usarse un ligador según la invención para desplazar la molécula de IgG, que puede ser un anticuerpo terapéutico de isotipo IgG 1, de la proximidad de la fase sólida de un ensayo inmmunosorbente de anticuerpo IgG4.

La Figura 4 es una figura esquemática que muestra cómo puede usarse una diana de anticuerpo, que es

ventajosamente un antígeno, como ligador para desplazar la molécula de IgG, que puede ser un anticuerpo terapéutico de isotipo IgG1, de la proximidad de la fase sólida en un ensayo inmunosorbente de anticuerpo de IgG4. La Figura 5 muestra cuatro muestras negativas de ADA, diluyente de ensayo y una muestra positiva de ADA ensayadas en el ensayo ImmunoCAP™ Specific IgG4 como se describe en la parte experimental siguiente usando 5 diferentes variantes de la prueba ImmunoCAP™ de infliximab.

- IFX: infliximab acoplado directa con la fase sólida ImmunoCAP™
- SA + bio-IFX: infliximab biotinilado unido a ImmunoCAP™ acoplado con estreptavidina según la invención, y
- TNFa + IFX: infliximab unido a ImmunoCAP™ acoplado con TNF- α según la invención.

10

Las dos últimas variantes son ejemplos según la presente invención de enlazamiento de una molécula de IgG con la fase sólida a través de un ligador para el análisis de anticuerpos IgG4.

La Figura 6 muestra siete muestras de suero definidas como positivas de ADA para infliximab usando otros ensayos 15 (las primeras siete barras mostradas), siete muestras definidas como negativas de ADA (las siguientes siete barras mostradas) y diluyente de ensayo (la última barra en gris) analizadas como se describe en el Ejemplo 2 a continuación.

PARTE EXPERIMENTAL

20

Los presentes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no deberían interpretarse como limitación de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1: Interferencia de ensayo causada por interacciones Fc-Fc

25

Puede mostrarse un ejemplo de interacciones Fc-Fc dedicadas a interferencia de ensayo usando anticuerpos terapéuticos con los dominios Fc de IgG1 humana de infliximab (un anticuerpo monoclonal quimérico contra factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) usado para tratar enfermedades autoinmunitarias, también conocido como Remicade y disponible, p. ej. en JANSSEN BIOTECH INC) o adalimumab (HUMIRA ("Human Monoclonal Antibody in Rheumatoid Arthritis") disponible, p. ej. en Abbott Labs) acoplados con pruebas de ImmunoCAP™ experimentales y usados en el ensayo comercial de ImmunoCAP™ Specific IgG4 (disponible en www.phadia.com). El ensayo tiene un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con enzima contra IgG4 humana como reactivo de detección. El anticuerpo de detección no tiene reactividad cruzada aparente con IgG1 humana (datos no mostrados). Los anticuerpos terapéuticos están acoplados covalentemente con la fase sólida usando los grupos amino reactivos del 30 anticuerpo terapéutico y grupos activados con CNBr de la matriz de esponja de celulosa que están dispuestos en la cápsula de prueba ImmunoCAP™. Esto da como resultado pruebas ImmunoCAP™ con altos niveles de fondo en el ensayo ImmunoCAP™ Specific IgG4 cuando se ensayan muestras de sujetos de control negativo sin ADA conocidos de infliximab o adalimumab (Tabla 1 siguiente, donde UR significa unidades de respuesta y n/d significa no disponible).

40

Tabla 1

Muestra	Infliximab		Adalimumab		Extracto de polen de abedul	
	UR	Conc. (mg A/l)	UR	Conc. (mg de A/l)	UR	Conc. (mg de A/l)
57951	3291	3,2	4487	4,7	86	<0,07
57952	2528	2,4	n/d	n/d	n/d	n/d
57960	9866	11,1	12607	16,4	417	0,3
57961	6459	6,7	n/d	n/d	n/d	n/d
57963	2019	1,9	n/d	n/d	n/d	n/d
Positivo de ADA	23538	55,1	n/d	n/d	n/d	n/d

Ejemplo 2: Acoplamiento de infliximab con fase sólida con y sin ligador

45 La longitud y naturaleza del ligador tienen que optimizarse para cada fase sólida y molécula de IgG. El ligador debería optimizarse para bajos niveles de fondo de ensayo y una alta relación de señal a ruido conservada para muestras positivas.

Este ejemplo muestra el efecto de usar ligadores para el enlazamiento de una molécula de IgG con una fase sólida 50 de un ensayo inmunosorbente de anticuerpo, y los resultados se presentan en las Figuras 5 y 6.

La Figura 5 presenta los resultados de un experimento que usa infliximab (IFX), un anticuerpo terapéutico de isotipo IgG1 (también conocido como Remicade, disponible, p. ej. en JANSSEN BIOTECH INC) enlazado según la invención con una fase sólida de ImmunoCAP™ (disponible por www.phadia.com) a través de ligador basado en el sistema de acoplamiento de estreptavidina/biotina y a través de un ligador basado en su ligando, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El acoplamiento directo de infliximab con la fase sólida da como resultado altos fondos del ensayo ImmunoCAP™ Specific IgG4 cuando se ensayan muestras negativas, mientras que el acoplamiento de infliximab a través de los ligadores da como resultado bajos fondos e inmunorreactividad retenida del fármaco. Se muestra una relación de señal a ruido ligeramente disminuida para la prueba de ImmunoCAP™ con infliximab unido a TNF- α .

10

La figura 6 presenta los resultados de un experimento que usa infliximab (IFX) enlazado según la invención con una fase sólida de ImmunoCAP™ va través de seroalbúmina humana (HSA) como ligador. El acoplamiento directo de infliximab con la fase sólida da como resultado altos fondos en el ensayo ImmunoCAP™ Specific IgG4 cuando se ensayan muestras negativas (Figura 6A), mientras que el acoplamiento según la invención a través de HSA como ligador da como resultado bajos fondos e inmunorreactividad retenida del fármaco (Figura 6B).

15

Ejemplo 3: Variación del tamaño del ligador

Se proporcionaron ligadores de diferentes tamaños y se ensayaron en un ensayo de infliximab según la invención. Se presentan los resultados en la Tabla 2 a siguiente.

20

Tabla 2

Resultados del ensayo específico de IgG4, infliximab (unidades de respuesta)						
Ligador	PM del ligador	Muestra positiva	Muestra negativa 1	Muestra negativa 2	Media de muestra negativa 1 y 2	Relación pos/neg
Sin ligador	N/A	19615	6574	8629	7602	2,6
Estreptavidina	53 kDa	22976	354	420	387	59,4
HSA	67 kDa	16504	265	317	291	56,7
Dend. PAMAM gen. 4	14 kDa	23215	462	563	513	45,3
Dend. PAMAM gen. 0	0,5 kDa	22096	358	478	418	52,9

Abreviaturas:

25

PM= Peso molecular

N/A =No aplicable

HSA= Seroalbúmina humana

Dend. PAMAM gen. 4= dendrímero PAMAM generación 4

Dend. PAMAM gen. 0= dendrímero PAMAM generación 0

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para reducir la unión inespecífica causada por interacciones Fc-Fc en un inmunoensayo, donde se analizan uno o más anticuerpos antifármaco (ADA) de isotipo IgG4 en una solución
5
- (a) poniendo en contacto la solución con una fase sólida con la que se han enlazado moléculas de IgG capaces de unión a dichos ADA;
(b) permitiendo que dichos ADA se unan específicamente a la molécula o moléculas de IgG, y retirando opcionalmente cualquier exceso de solución;
- 10 (c) añadiendo un anticuerpo específico de IgG4 marcado capaz de unión específica a ADA;
(d) retirando cualquier exceso de reactivo; y
(e) detectando el marcaje unido o no unido para determinar directa o indirectamente la presencia o concentración de ADA en la solución,
- 15 donde, en la etapa a), la molécula o moléculas de IgG se han separado de la fase sólida a través de un ligador, y donde dicho ligador reduce la extensión de los cambios inducidos por la fase sólida en la estructura de moléculas de IgG enlazadas, que facilitan las interacciones Fc-Fc entre las moléculas de IgG enlazadas y anticuerpo específico de IgG4 al distanciar las moléculas de IgG enlazadas de la proximidad de la fase sólida.
- 20 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde los ADA están dirigidos contra un fármaco de IgG1.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde las moléculas de IgG se seleccionan del grupo consistente en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 25 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligador es una molécula orgánica, un aminoácido, un péptido, una proteína o molécula de origen proteico, un monosacárido, un oligosacárido o un polisacárido.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligador se forma
30 por acoplamiento covalente de la molécula o moléculas de IgG con moléculas que se extienden desde una fase sólida compuesta por polímero natural, tal como celulosa.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la molécula o moléculas de IgG son un anticuerpo con especificidad conocida y el ligador es su ligando diana.
35
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la molécula o moléculas de IgG se han marcado con biotina y el ligador es estreptavidina.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la molécula o moléculas de
40 IgG son al menos una proteína de fusión entre una molécula de unión a ligando y la región Fc de la molécula de IgG, y el ligador es su ligando diana.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo específico de IgG4 marcado capaz de unión a anticuerpos formados endógenamente es un anticuerpo monoclonal o
45 policlonal.
10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la solución es una muestra biológica.
- 50 11. Uso de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para monitorizar la respuesta de anticuerpo de un paciente a un anticuerpo terapéutico.
12. Uso de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en el desarrollo de
55 fármacos.

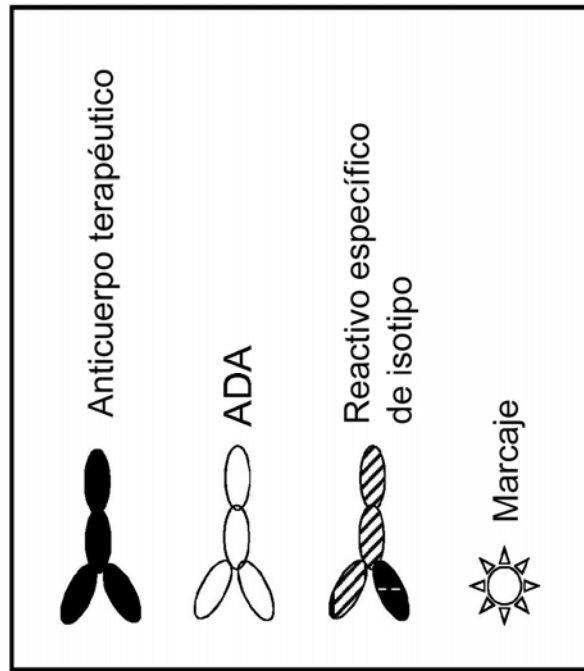
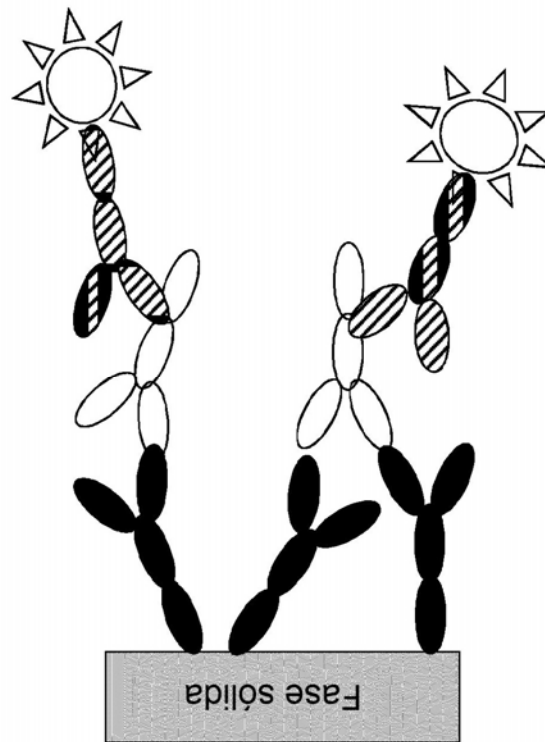


Figura 1



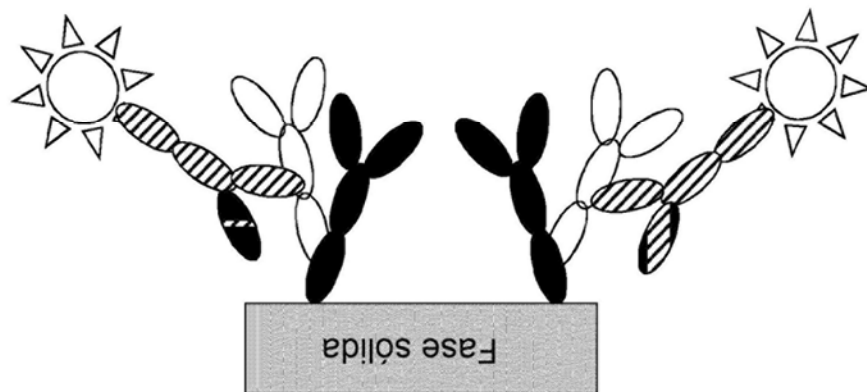
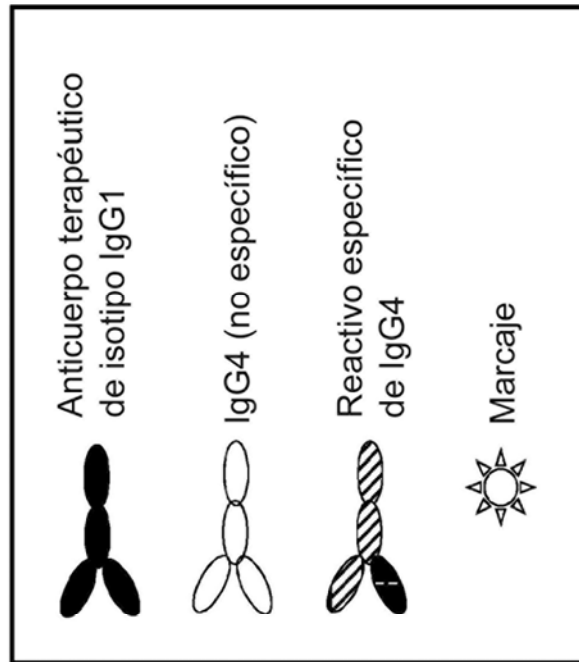


Figura 2

Figura 3

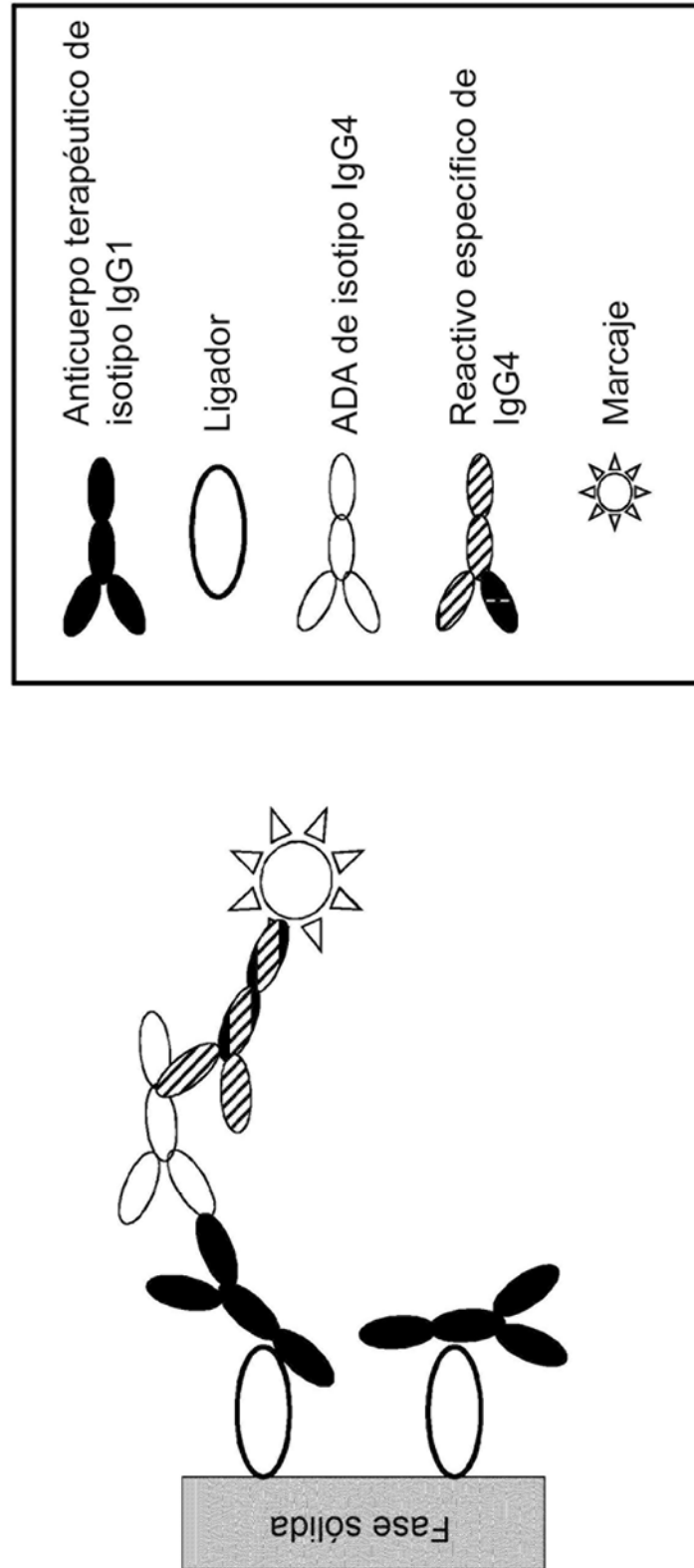
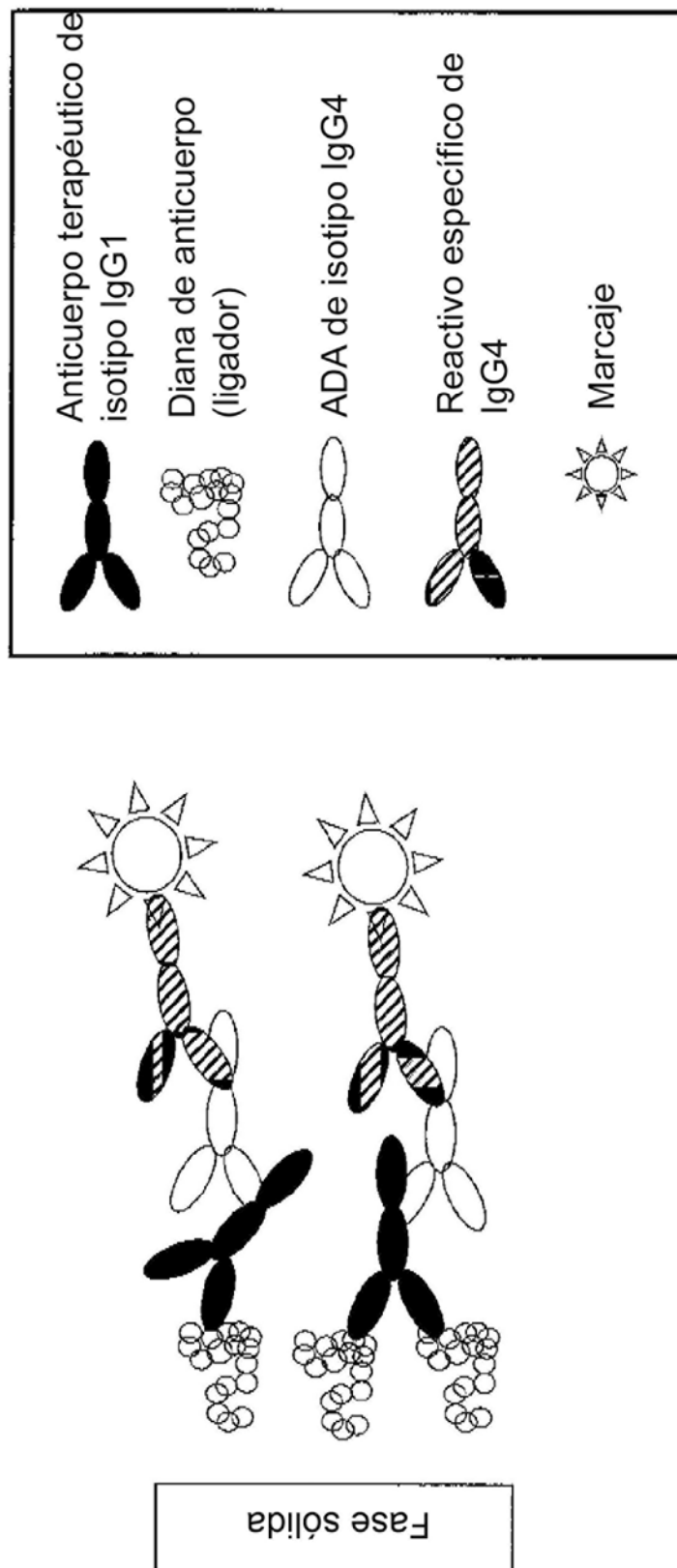


Figura 4



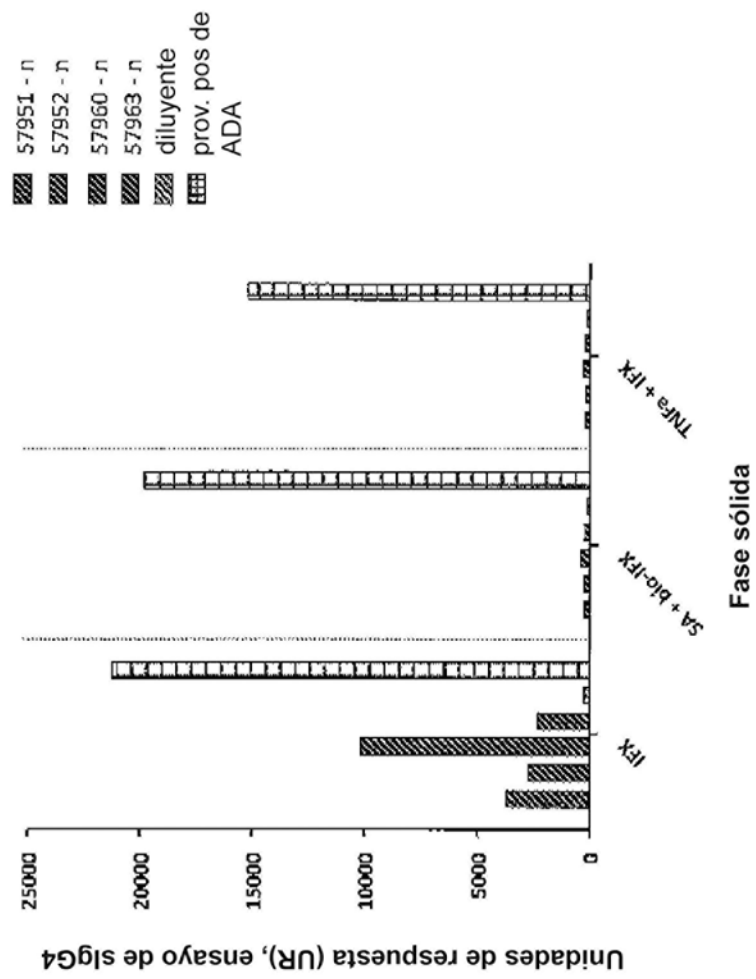


Figura 5

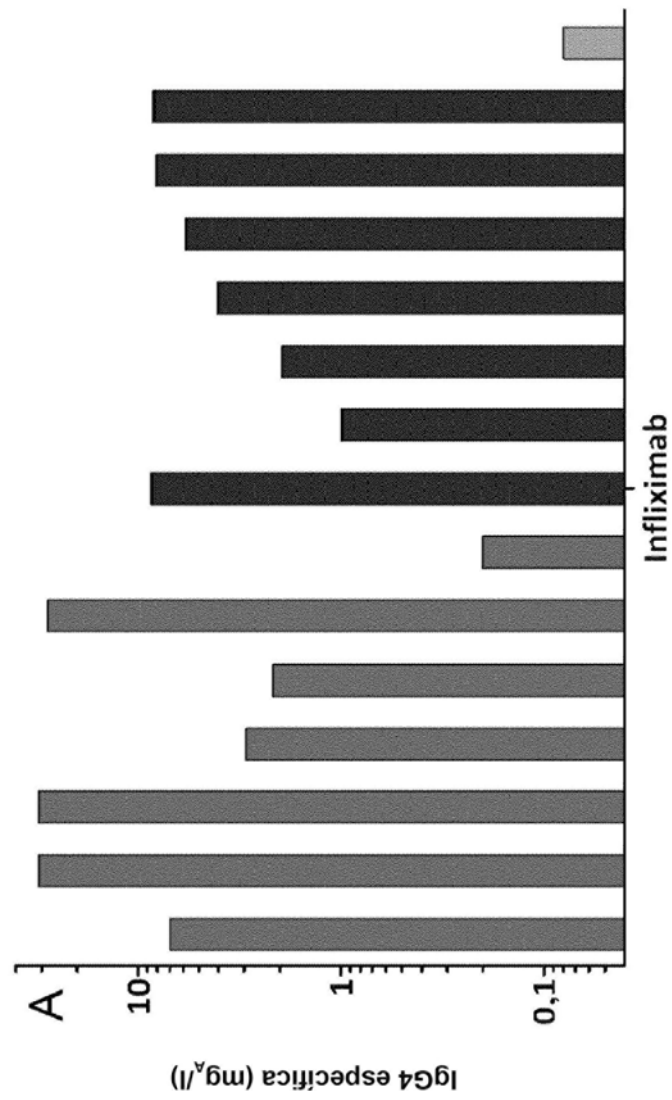


Figura 6A

