

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 403**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2015 PCT/US2015/015442**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2015 E 15710304 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3105592**

54 Título: **Ensayos para detectar la presencia o cantidad de un anticuerpo antifármaco**

30 Prioridad:

11.02.2014 US 201461938556 P

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

25.03.2019

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**GRABERT, RYAN;
RICHARDS, SUSAN;
THEOBALD, VALERIE;
XU, YUANXIN y
ZOGHBI, JAD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 705 403 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos para detectar la presencia o cantidad de un anticuerpo antifármaco

Reivindicación de la prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. n.º de serie 61/938.556, presentada el 11 de febrero, 2014.

Campo técnico

Esta invención se refiere a métodos y kits para detectar la presencia de anticuerpos antifármaco en una muestra y, más en concreto, a métodos y kits para detectar anticuerpos antifármaco en presencia de un fármaco en la muestra.

Antecedentes

10 La introducción de productos bioterapéuticos (por ejemplo, agentes biológicos tales como proteínas, péptidos, nucleótidos, etc.) ha dado un gran impulso al tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria del intestino, la espondilitis anquilosante, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide. En muchos casos, estos agentes biológicos han demostrado tener un gran éxito en la práctica clínica. Se sabe que los agentes biológicos, incluyendo
15 los anticuerpos terapéuticos, tienen un potencial inmunogénico, y la administración de proteínas terapéuticas a un paciente puede inducir una respuesta inmunológica que conduzca a la formación de anticuerpos antifármaco ("ADAs"). Estos ADAs pueden reducir la eficacia de la proteína terapéutica. Por ejemplo, pueden unirse y/o neutralizar a la proteína terapéutica, dando como resultado cambios en la farmacocinética o la farmacodinámica del fármaco que alteren la eficacia del fármaco. Los ADAs pueden provocar graves efectos secundarios, incluyendo reacciones alérgicas, reactividad cruzada contra proteínas endógenas por anticuerpos neutralizantes (NABs), y la activación del
20 complemento. Se ha descrito la producción de ADAs para varios anticuerpos monoclonales disponibles para el tratamiento de la artritis reumatoide (adalimumab e infliximab), la enfermedad de Crohn (infliximab), la esclerosis múltiple (natalizumab y alemtuzumab) y la psoriasis de placas (adalimumab). En algunos pacientes, los beneficios clínicos proporcionados por dichas proteínas terapéuticas disminuyen a lo largo del tiempo debido a la formación de ADAs. La evaluación del riesgo de inmunogenicidad es clave para comprender la frecuencia y la gravedad de los ADAs inducidos por fármacos. Se ha dado a conocer la reactividad cruzada de NAB con proteínas endógenas que provoca el
25 síndrome de depleción (eritropoyetina).

Habiéndose aprobado una gran cantidad de proteínas terapéuticas para uso clínico, la inmunogenicidad de estos productos ofrece información a los médicos, los fabricantes y las agencias reguladoras. Se sabe que ciertas sustancias afectarán a la detección o la cuantificación de un analito en inmunoensayos (o ensayos de unión de ligandos). Estos
30 factores de interferencia, que incluyen pero no se limitan a fármacos en circulación, tienen un impacto negativo sobre la especificidad, la precisión y la sensibilidad del ensayo. La "interferencia de fármacos" que reduce la "tolerancia a fármacos" del ensayo de ADA se considera un reto técnico importante para la evaluación de la inmunogenicidad para monitorizar los ADA como parte de la monitorización del paciente para determinar la eficacia y la seguridad clínicas de fármacos.

35 Aunque las estrategias anteriores muestran algunas mejoras en la tolerancia a fármacos, la sensibilidad y la precisión relativa no se mantienen en comparación con la detección de ADA sin fármaco, con lo que existe el riesgo de aparición de falsos negativos y la infradetección de la incidencia y titulación de ADA en pacientes tratados. A pesar de los documentos de orientaciones reguladoras de la industria y de los documentos oficiales que recomiendan una sensibilidad entre 250 y 500 ng/ml [Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L. et al.: Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products, Journal of
40 Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 48(5), 1267-1281 (2008); Mire-Sluis A.R., Barrett Y.C., Devanarayan V. et al.: Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products, Journal of Immunological Methods, 289(1-2), 1-16 (2004)], a veces la tolerancia a fármacos se evalúa sin ningún criterio de aprobación y después se elaboran los protocolos clínicos que prescriben largos periodos de depuración antes de realizar las mediciones de anticuerpos para permitir la eliminación del fármaco y evitar los resultados falsos negativos debido a la interferencia del fármaco. Esta estrategia no resulta deseable debido a los riesgos de no tener en cuenta la evaluación de los ADA en momentos tempranos, especialmente en el caso con un fármaco de semivida larga y/o de regímenes de múltiples dosificaciones, y la estrategia de periodo de depuración no es factible. Algunos métodos no basados en la unión de ligandos, tales como espectrometría de masas,
45 han sido evaluados para determinar la PK en presencia de interferencia de ADA, pero la sensibilidad del ensayo prevista no ha resultado aceptable y es necesario un enriquecimiento del analito, que se basa en la unión a ligando, lo que presenta problemas similares.

50 Se ha empleado con éxito una diversidad de formatos de ensayo para detectar los ADAs, incluyendo ELISA (directo, indirecto y de formación de puentes), radioinmunoensayos, electroquimioluminiscencia, y resonancia de plasmones de superficie. Sin embargo, el desarrollo de estos ensayos a menudo se complica por la interferencia provocada por la presencia del fármaco. El problema de las interferencias analíticas en los ensayos de unión de ligandos se conoce desde hace tiempo. Con la aparición de las terapias de anticuerpos monoclonales de larga vida, la necesidad de técnicas específicas para detectar ADA en presencia de fármacos es un problema importante. Las estrategias más

ampliamente adoptadas en uso en la actualidad aún presentan limitaciones de sincronización, sensibilidad o precisión. Así, en la técnica son necesarios métodos y kits para detectar, de modo más preciso y reproducible, la presencia de ADA en muestras, tales como muestras biológicas.

Sumario

5 La presente invención se define en las reivindicaciones anejas.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de un nuevo método de ensayo que es eficaz para reducir o eliminar los problemas provocados por la interferencia por un fármaco o diana en la detección de ADA. En particular, la presente invención se basa en el desarrollo de un nuevo ensayo de ADA que comprende las siguientes etapas ejemplares. En primer lugar, se añade un exceso de material de fármaco a las muestras que contienen los ADAs potenciales (tanto ADAs libres como complejos de ADA/fármaco) para que se unan todos los ADAs libres remanentes, formando complejos de fármaco/ADA. En segundo lugar, estos complejos se precipitan empleando polietilenglicol. En tercer lugar, después de una serie de lavados para eliminar las inmunoglobulinas y proteínas séricas, el precipitado final (complejos de fármaco/ADA) se reconstituye con una disolución para disociar los complejos, y después se reviste sobre una superficie grande (en condiciones para mantener separados el fármaco y los ADA) o un sustrato (por ejemplo, una placa de carbono de alto potencial de unión con una alta capacidad de revestimiento) durante un tiempo suficiente para permitir el revestimiento de todos los fármacos libres y ADAs libres disociados. En cuarto lugar, después se realiza una detección específica de los niveles de ADA totales, empleando fármacos marcados. Por consiguiente, la presente invención se refiere a métodos, composiciones y kits para determinar la presencia o cantidad de un ADA en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica).

20 En una realización, el precipitado final (complejos de fármaco/ADA) se reconstituye con una disolución de ácido para disociar los complejos, y después se reviste sobre una superficie grande (en condiciones ácidas para mantener separados el fármaco y los ADA) o un sustrato (por ejemplo, una placa de carbono de alto potencial de unión con una alta capacidad de revestimiento) durante un tiempo suficiente para permitir el revestimiento de todos los fármacos libres y ADAs libres disociados. El entorno ácido evita que los complejos vuelvan a formarse mientras están inmovilizados sobre la superficie del sustrato. Cuando se emplea una disolución de ácido para disociar los complejos, el ensayo puede denominarse un ensayo PandA (PEG y ácido).

30 En otra realización de la presente descripción, el precipitado final (complejos de fármaco/ADA) se reconstituye con una disolución básica para disociar los complejos, y después se reviste sobre una superficie grande (en condiciones básicas para mantener separados el fármaco y los ADA) o un sustrato (por ejemplo, una placa de carbono de alto potencial de unión con una alta capacidad de revestimiento) durante un tiempo suficiente para permitir el revestimiento de todos los fármacos libres y ADAs libres disociados. El entorno básico evita que los complejos vuelvan a formarse mientras están inmovilizados sobre la superficie del sustrato.

35 La selección de una disolución de ácido o de base dependerá de los parámetros del fármaco (por ejemplo, el fármaco biológico), tales como el pI, o la presencia de ciertos enlaces de conjugación, y la selección deberá tener un efecto mínimo sobre la integridad y la estructura del fármaco.

En algunas realizaciones, la etapa de incubación después de la adición inicial de ácido o base puede realizarse a 22°C, 23°C, 25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C o mayor.

En algunas realizaciones, después de la etapa de precipitación final, cada muestra puede diluirse aún más hasta una dilución de muestra final de, por ejemplo, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:50, o 1:60.

40 En un aspecto, la descripción proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un ADA en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una cantidad en exceso de un fármaco al que se une el ADA para formar complejos de fármaco/ADA, poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG) para formar un precipitado que comprende complejos de fármaco/ADA, poner en contacto el precipitado con una disolución para disociar los complejos de fármaco/ADA, inmovilizar sobre una superficie y/o un sustrato los ADAs disociados, y determinar la presencia o cantidad de dicho ADA. En otro aspecto, la etapa de determinación comprende poner en contacto el ADA inmovilizado con un fármaco conjugado con un marcador detectable, y determinar la presencia o cantidad de dicho marcador detectable, para determinar de ese modo la presencia o la cantidad (título) del ADA en la muestra.

50 En algunas realizaciones, el método para determinar la presencia o ausencia de un ADA en una muestra comprende además, antes, después o como parte de la etapa de determinación, determinar la cantidad de ADA en la muestra.

En algunas realizaciones, el método para determinar la presencia o la ausencia de un ADA en una muestra biológica comprende además, después de la etapa de inmovilización, tratar (por ejemplo, lavar) el soporte para eliminar el fármaco no unido.

55 En otras realizaciones, el método para determinar la presencia o la ausencia de un ADA en una muestra biológica comprende además, después de poner en contacto la muestra con PEG, lavar el precipitado.

En todavía otras realizaciones, el método comprende además inmovilizar el fármaco sobre el sustrato, antes, después o durante la etapa de inmovilizar el ADA sobre el sustrato.

5 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para reducir la interferencia en un ensayo de fármacos (por ejemplo, un ensayo de PK del fármaco, un ensayo de cuantificación de fármacos, o un ensayo de potencia del fármaco) debida a la presencia de un ADA en la muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una cantidad en exceso de ADA para saturar el fármaco libre y formar complejos de fármaco/ADA, poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG) para formar de ese modo un precipitado que comprende los complejos de fármaco/ADA, poner en contacto el precipitado con una disolución para disociar los complejos de fármaco/ADA, inmovilizar sobre un sustrato en condiciones ácidas el fármaco disociado, y realizar el ensayo de fármacos empleando para el fármaco un reactivo de detección específico, para reducir de ese modo la interferencia del ADA. El ensayo de fármacos puede ser, por ejemplo, un ensayo de cuantificación de fármacos, un ensayo de PK del fármaco, o un ensayo de potencia del fármaco.

15 En algunas realizaciones, el método para reducir la interferencia en un ensayo de fármacos debida a la presencia de un ADA comprende además determinar la presencia o ausencia, o cantidad, del fármaco en la muestra empleando un anticuerpo anti-idiotipo marcado con un marcador detectable.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente comprenden además diluir la muestra antes de ponerla en contacto con una cantidad en exceso del fármaco. Por ejemplo, la muestra se diluye 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 veces antes de ponerla en contacto con una cantidad en exceso del fármaco.

20 En otras realizaciones, la muestra comprende una muestra biológica, en la que la muestra biológica comprende un material seleccionado del grupo que consiste en fluidos corporales, secreciones mucosas, saliva, sangre, sangre completa, plasma o suero. En algunas realizaciones, la muestra comprende un fármaco.

25 En todavía otras realizaciones, el fármaco comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, un anticuerpo de afinidad dual, un diacuerpo, sustancias biológicas de múltiples dominios (tales como un conjugado de fármaco-anticuerpo), un ácido nucleico (ARNpi, oligonucleótidos antisentido, fármacos de terapia génica), un péptido o un polipéptido (nativo o modificado), un peptidomimético, un carbohidrato, un lípido, o un compuesto de molécula pequeña orgánico o inorgánico, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, el fármaco comprende un anticuerpo terapéutico, un producto terapéutico de proteína, una enzima, una proteína de unión modificada, una proteína similar a un anticuerpo modificada, una proteína de fusión, una proteína estructural, o cualquiera de sus combinaciones. Cuando el fármaco comprende un anticuerpo o uno de sus fragmentos, el anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el fármaco es un fármaco modificado para que muestre menos inmunogenicidad, en comparación con el mismo fármaco en una forma no modificada (es decir, el fármaco ha sido modificado para que sea menos inmunogénico).

35 En algunas realizaciones, el sustrato comprende una superficie de carbono, una superficie de vidrio, una superficie de sílice, una superficie metálica, un material polimérico, una superficie que contiene un revestimiento metálico o químico, una membrana, una perla (por ejemplo, una micropelra), una matriz polimérica porosa, un sustrato que comprende fibras celulósicas, o cualquiera de sus combinaciones. El sustrato puede comprender un material polimérico, en el que el material polimérico se selecciona del grupo que consiste en poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, poliamida y policarbonato.

40 En algunas realizaciones, el sustrato comprende una superficie de carbono porosa. En una realización, el sustrato es una placa de carbono de alto potencial de unión.

En algunas realizaciones, el sustrato comprende una gran superficie con alta capacidad de revestimiento. Un sustrato que comprende una gran superficie con alta capacidad de revestimiento incluye, por ejemplo, una placa de carbono de alto potencial de unión (por ejemplo, un MSD (Meso Scale Discovery®, Rockville, Maryland)).

45 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados comprenden poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG) para formar un precipitado que comprende complejos de fármaco/ADA. El PEG comprende al menos un compuesto de PEG que tiene un peso molecular entre 1.000 y 40.000 daltons, incluyendo, por ejemplo, al menos un compuesto de PEG seleccionado del grupo que consiste en PEG1000, PEG1450, PEG3000, PEG6000, PEG8000, PEG10000, PEG14000, PEG15000, PEG20000, PEG250000, PEG30000, PEG35000, y PEG40000.

50 En una o más realizaciones, la muestra se pone en contacto con PEG a una concentración de entre alrededor de 0,1% y alrededor de 10,0%, alrededor de 0,2% y alrededor de 7,0%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 6,0%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 5,0%, entre alrededor de 1,5% y alrededor de 5,5%, entre alrededor de 2,0% y alrededor de 5,0%, entre alrededor de 3,0% y alrededor de 4,5%, entre alrededor de 3,5% y alrededor de 4,0%, entre alrededor de 1,0% y alrededor de 2,5%, entre alrededor de 1,2% y alrededor de 1,5%, o de alrededor de 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 55 9,0%, 9,5% o de alrededor de 10,0% de PEG.

En otras realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto un precipitado que comprende un ADA y/o un complejo de ADA/fármaco con una disolución de ácido. La disolución de ácido puede comprender un ácido orgánico,

- un ácido inorgánico, o una de sus mezclas. En algunos aspectos, la disolución de ácido comprende un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glutámico, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico, ácido trifluoroacético, ácido bencenosulfónico, ácido aminometansulfónico, ácido canfo-10-sulfónico, ácido cloroacético, ácido bromoacético, ácido yodoacético, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido glicérico, ácido succínico, ácido málico, ácido aspártico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, y cualquiera de sus combinaciones. En una realización ejemplar, la disolución de ácido comprende ácido acético. Para los métodos que comprenden poner en contacto un precipitado que comprende un ADA y/o un complejo de ADA/fármaco con una disolución de ácido, el precipitado se pone en contacto con un ácido a una concentración entre alrededor de 0,1 M y alrededor de 5 M.
- 5
- 10 También se describen métodos que comprenden poner en contacto un precipitado que comprende un ADA y/o un complejo de ADA/fármaco con una disolución de base. La disolución de base puede comprender una base orgánica, una base inorgánica, o una de sus mezclas. En algunos aspectos, la disolución de base comprende una base seleccionada del grupo que consiste en urea, hidróxido de sodio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de calcio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario, hidróxido de cinc, hidróxido de litio, acetona, metilamina, y amoniaco.
- 15 Para los métodos que incluyen poner en contacto un precipitado que comprende un ADA y/o un complejo de ADA/fármaco con una disolución básica, el precipitado se pone en contacto con una base a una concentración entre alrededor de 0,1 M y alrededor de 1 M.

En algunos aspectos, la descripción proporciona anticuerpos, anticuerpos antifármaco y fármacos marcados (por ejemplo, conjugados) con un marcador detectable. El marcador detectable comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en un hapteno, un isótopo radiactivo, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, y un marcador electroquimioluminiscente, un primer miembro de una pareja de unión, y un sustrato para una reacción de detección enzimática. En una realización, el marcador detectable comprende un marcador electroquimioluminiscente que comprende un marcador sulfo-TAG®.

20

En algunas realizaciones, el marcador detectable comprende un fluoróforo, en el que el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en proteína fluorescente verde, proteína fluorescentes azul, proteína fluorescente roja, fluoresceína, 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), tintes de cianina (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7), tintes Bodipy (Invitrogen) y/o tintes Alexa Fluor (Invitrogen), dansilo, cloruro de dansilo (DNS-C1), 5-(yodoacetamida)fluoresceína (5-IAF, 6-acrilolil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodano), cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD-CI), bromuro de etidio, amarillo Lucifer, tintes de rodamina (hidrocloruro de 5-carboxirrodamina 6G, cloruro de lisamina-rodamina B-sulfonilo, isotiocianato de rodamina-B (RITC (isotiocianato de rodamina-B), rodamina 800); 5-(y 6-)isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)), Rojo Texas™, cloruro de sulfonilo, ácidos naftalaminsulfónicos, incluyendo, pero no se limitan a, ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS) y ácido 6-(p-toluidinil)naftalen-2-sulfónico (TNS), ácido graso de antróilo, DPH, ácido parinámico, TMA-DPH, ácido graso de fluorenilo, fluoresceína-fosfatidiletanolamina, Rojo Texas-fosfatidiletanolamina, pirenil-fosfatidilcolina, fluorenil-fosfatidilcolina, Merocianina 540, naftilestirilo, 3,3'-dipropiltiadicarbocianina (diS-C3-(5)), 4-(p-dipentilaminoestiril)-1-metilpiridinio (di-5-ASP), Cy-3 yodoacetamida, Cy-5-N-hidroxisuccinimida, Cy-7-isotiocianato, IR-125, Naranja de Tiazol, Azul B, Azul del Nilo, Al ftalocianina, Oxaxina 1, 4',6'-diamidino-2-fenilindol, (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, Naranja de Acridina, homodímero de etidio, N-(etoxicarbonilmetil)-6-metoxiquinolinio (MQAE), Fura-2, verde de calcio, carboxi SNARF-6, BAPTA, cumarina, fitofluór y coroneno.

25

30

35

En algunas realizaciones, el marcador detectable comprende una enzima que catalizar una reacción de cambio de color, incluyendo una enzima seleccionada del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, ureasa y beta-lactamasa y glucosa oxidasa.

40

En algunas realizaciones, el marcador detectable comprende un primer miembro de una pareja de unión o un segundo miembro de una pareja de unión, en el que la pareja de unión se selecciona del grupo que consiste en biotina/estreptavidina, biotina/avidina, biotina/neutravidina, biotina/captavidina, epítipo/anticuerpo, proteína A/inmunoglobulina, proteína G/inmunoglobulina, proteína L/inmunoglobulina, GST/glutaciona, etiqueta de His/níquel, antígeno/anticuerpo, FLAG/anticuerpo M1, proteína de unión a maltosa/maltosa, proteína de unión a calmodulina/calmodulina, enzima-sustrato de enzima, y parejas de unión de receptor-ligando.

45

En algunas realizaciones, el marcador detectable comprende un primer miembro de una pareja de unión; y el segundo miembro de la pareja de unión está conjugado a una enzima, un epítipo de anticuerpo, un antígeno, un fluoróforo, un radioisótopo, una nanopartícula, un miembro de una segunda pareja de unión, y un quelato de metal.

50

En otras realizaciones, el marcador detectable comprende un primer miembro de una pareja de unión, en el que el primer miembro de la pareja de unión es biotina y el segundo miembro de la pareja de unión se selecciona del grupo que consiste en estreptavidina, avidina, neutravidina y capravidina, y el segundo miembro de la pareja de unión está conjugado a una enzima.

55

Los métodos proporcionados en la presente pueden realizarse en una plataforma instrumental manual o automática, dependiendo del número de muestras que se van a ensayar.

Los "anticuerpos antifármaco" o "ADAs" son anticuerpos que se unen específicamente a cualquier región de un

fármaco. Por ejemplo, un anticuerpo antifármaco puede ser un anticuerpo, o su fragmento, que puede dirigirse contra cualquier región de un anticuerpo de fármaco, por ejemplo el dominio variable, los dominios constantes, o la glicoselectura del anticuerpo). Tales anticuerpos antifármaco pueden aparecer durante la terapia con fármacos como una reacción inmunogénica del paciente. Un ADA puede ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgM, IgE, IgA, IgG, IgD) o subclase de IgG (IgG1, 2, 3, y 4). Los ADA incluyen ADAs de cualquier fuente animal, incluyendo, por ejemplo, fuentes de seres humanos o de animales no humanos (por ejemplo, veterinarias).

Para los fines de la presente memoria descriptiva, el término "NAb" o "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que se une a una molécula producida de modo endógeno, por ejemplo un anticuerpo, un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético, un carbohidrato o un lípido. Por ejemplo, un NAb puede ser una proteína producida de modo endógeno, tal como, por ejemplo, eritropoyetina o insulina. El NAb puede o no reducir (por ejemplo, neutraliza) al menos una actividad biológica de la molécula producida de modo endógeno.

Por ejemplo, en algunos aspectos, la descripción proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de NAb en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una cantidad en exceso de un antígeno al que se une el NAb para formar complejos de antígeno/NAb, poner en contacto los complejos de antígeno/NAb con polietilenglicol (PEG) para formar un precipitado que comprende los complejos de antígeno/NAb, poner en contacto el precipitado con una disolución para disociar los complejos de antígeno/NAb, inmovilizar sobre una superficie y/o un sustrato los NAb disociados, y determinar la presencia o cantidad de dicho NAb. En otro aspecto, la etapa de determinación comprende poner en contacto el NAb inmovilizado con un antígeno al que se une el NAb conjugado con un marcador detectable, y determinar la presencia o cantidad de dicho marcador detectable, para determinar de ese modo la presencia o cantidad (título) del NAb en la muestra.

En el contexto de la invención, el término "paciente" se refiere a cualquier sujeto, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano, con una enfermedad, o sospechoso de tener una enfermedad. El término "sujeto", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un sujeto humano o un sujeto animal no humano). En algunos casos, el sujeto es un mamífero. En algunos casos, el término "sujeto", tal como se emplea en la presente, se refiere a un ser humano (por ejemplo, un hombre, una mujer, o un niño). En algunos casos, el término "sujeto", tal como se emplea en la presente, se refiere a un animal de laboratorio de un estudio de un modelo animal.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "muestra biológica" o el término "muestra" se refiere a una muestra obtenida o derivada de un paciente, que comprende una inmunoglobulina derivada de un paciente, y por tanto puede denominarse una muestra de inmunoglobulina. A título de ejemplo, una muestra biológica comprende un material seleccionado del grupo que consiste en fluidos corporales, sangre, sangre completa, plasma, suero, secreciones mucosas, saliva, fluido cerebroespinal (CSF), fluido de lavado bronquioalveolar (BALF), fluidos del ojo (por ejemplo, humor vítreo, humor acuoso), fluido linfático, tejido de ganglios linfáticos, tejido de bazo, médula ósea, y una fracción enriquecida en inmunoglobulinas derivada de uno o más de estos tejidos. En algunas realizaciones, la muestra es o comprende suero sanguíneo, o es una fracción enriquecida en inmunoglobulinas derivada de suero sanguíneo o sangre. La muestra es o puede derivarse (obtenerse) de un fluido corporal o un tejido corporal. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene de un sujeto que ha sido expuesto al fármaco, tal como expuesto repetidamente al mismo fármaco. En otras realizaciones, la muestra se obtiene de un sujeto que no ha sido expuesto recientemente al fármaco, o se obtiene del sujeto antes de la administración planeada del fármaco.

El término "sustrato", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier material o complejo macromolecular al cual puede unirse un ADA o material de fármaco (por ejemplo, un anticuerpo, un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético, un carbohidrato, un lípido, o un compuesto de molécula pequeña orgánico o inorgánico). La composición y/o superficie del sustrato debe permitir la unión de un ADA o material de fármaco en condiciones ácidas (o condiciones básicas) que permitan la disociación de los complejos de ADA/fármaco. En algunas realizaciones, estos sustratos tienen una alta capacidad de carga, que mejora la sensibilidad, permitiendo así la detección de ADAs y/o materiales de fármaco presentes en concentraciones relativamente bajas. Los ejemplos de sustratos que se emplean habitualmente incluyen, pero no se limitan a, superficies de carbono (por ejemplo, una placa de carbono porosa o de alto potencial de unión), superficies de vidrio, superficies de sílice, superficies plásticas, superficies metálicas, superficies que contienen un revestimiento metálico o químico, membranas (por ejemplo, nailon, polisulfona, sílice), microperlas (por ejemplo, látex, poliestireno, u otro polímero), matrices poliméricas porosas (por ejemplo, gel de poliacrilamida, polisacáridos, polimetacrilato), y sustratos que comprenden fibras celulósicas (por ejemplo, esponja de celulosa, papel de celulosa). En un aspecto, la placa de carbono porosa o de alto potencial de unión es una placa de alto potencial de unión MSD (Meso Scale Discovery®). El sustrato puede ser un chip biodetector, una micromatriz o un sistema Lab-on-Chip capaz de detectar una molécula diana. Puede utilizarse cualquier tipo de biodetector que sea capaz de detectar la unión específica al chip biodetector, incluyendo los biodetectores comercialmente disponibles, tales como los biodetectores producidos por Biacore.

Tal como se emplea en la presente, una entidad (por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo antifármaco, un fármaco, una proteína, una enzima, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un producto bioterapéutico de múltiples dominios (por ejemplo, conjugados de fármaco y anticuerpo), o especies relacionadas) que está modificada por el término "marcado" incluye cualquier entidad que está conjugada con otra molécula o entidad química que puede ser detectada de modo empírico (por ejemplo, un "marcador detectable"). Las especies químicas adecuadas como marcadores para entidades marcadas incluyen, pero no se limitan a, enzimas, tintes fluorescentes, puntos cuánticos,

tintes ópticos, tintes luminiscentes y radionúclidos.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “uno o más” incluye al menos uno, de forma más adecuada uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, veinte, cincuenta, cien, quinientos, etc., del artículo al que se refiere “uno o más”.

5 La estrategia descrita en la presente ha demostrado eliminar la interferencia de fármacos en los ensayos de ADA. En la práctica, este principio del método puede aplicarse para reducir/eliminar las interferencias en cualquier tipo de inmunoensayo. Este principio del método también puede utilizarse para cualquier ensayo de unión de ligandos para ADA, PK y biomarcadores. Los métodos descritos en la presente pueden aplicarse a ensayos de unión de ligandos para ensayar anticuerpos neutralizantes (NAb). Los ensayos de unión de ligandos pueden incluir la inhibición competitiva de la unión de fármacos a la diana farmacéutica. En los ensayos de PK y de biomarcadores, puede añadirse un exceso de anticuerpo para la formación de complejos y, tras la precipitación y la disociación con ácidos; la detección se realiza empleando un anticuerpo de detección marcado. En todos los casos, es importante optimizar la concentración de PEG en el ensayo para equilibrar la sensibilidad y la especificidad. Cuanto mayor sea la concentración de PEG, precipitará la proteína de menor peso molecular. Por tanto, para precipitar específicamente el complejo deseado que contiene el analito diana (tal como la precipitación del complejo de anticuerpo-fármaco), es necesario minimizar la cantidad de proteínas no específicas no unidas que se van a precipitar (tales como IgM e IgG séricas). En los estudios se empleó la placa de alto potencial de unión MSD debido a su estructura de carbono y porosa. Basándose en el principio de diseño del ensayo, también podrían funcionar otras superficies de revestimiento de gran capacidad.

20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente el experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen en la presente para uso en la presente invención; también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos, y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

25 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una representación esquemática de una realización de un ensayo de ADA según la invención.

30 Las FIG. 2A y 2B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 8 µg/ml a 125 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco A (0, 1, 10 y 100 µg/ml) ensayadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD sin disociación con ácidos. A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con respecto a la línea de base. ADA: ensayo de formación de puentes MSD; formación de puentes Meso Scale Discovery®; S/B: señal frente al fondo.

35 Las FIG. 3A y 3B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 8 µg/ml a 125 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco A (0, 1, 10 y 100 µg/ml) ensayadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD con disociación con ácidos. A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con respecto a la línea de base. S/B: señal frente al fondo.

40 Las FIG. 4A y 4B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 8 µg/ml a 125 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco A (0, 1, 10 y 100 µg/ml) ensayadas en el formato de formación de puentes MSD utilizando el formato de ensayo de precipitación con polietilenglicol y disociación con ácidos de la invención (es decir, el formato de ensayo PandA). A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con relación a la línea de base. S/B: señal frente al fondo.

45 Las FIG. 5 es una gráfica que representa los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad antifármaco A sin fármaco ensayado en el formato de ensayo de PEG y ácido (PandA) utilizando tres lotes diferentes de placas de alto potencial de unión MSD. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA. ADA: anticuerpo antifármaco; S/B: señal frente al fondo.

50 La FIG. 6 es una gráfica que representa los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar

que detecta ADAs del fármaco B en muestras de suero normal reunidas (n = 32) evaluadas en el formato de ensayo MSDB con y sin disociación con ácido. Distribución de la población normal (ensayos de formación de puentes del fármaco B). Sin tratamiento = sin disociación; Tratado con ácido = con disociación con ácido; S/B: señal frente al fondo.

5 La FIG. 7 es una gráfica que representa los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta ADAs del fármaco B en muestras de suero de línea de base de enfermedad reunidas (n = 16) evaluadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD con y sin disociación con ácido, así como en el formato de ensayo Panda, para determinar la distribución de la población.

10 Las FIG. 8A y 8B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 4 µg/ml a 31,3 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco B (0, 10, 50 y 250 µg/ml) ensayadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD sin disociación con ácido. A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con respecto a la línea de base. S/B: señal frente al fondo.

15 Las FIG. 9A y 9B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 4 µg/ml a 31,3 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco B (0, 10, 50 y 250 µg/ml) ensayadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD empleando el formato de ensayo Panda. A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con respecto a la línea de base. S/B: señal frente al fondo.

20 Las FIG. 10A y 10B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 8 µg/ml a 125 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco C (0, 2,5, 25 y 250 µg/ml) ensayadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD con disociación con ácido. A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con respecto a la línea de base. S/B: señal frente al fondo.

25 Las FIG. 11A y 11B son gráficas que representan los resultados de un formato de ensayo de formación de puentes ejemplar que detecta un anticuerpo de conejo purificado por afinidad a unos niveles que varían de 8 µg/ml a 125 ng/ml con diversas concentraciones del fármaco C (0, 2,5, 25 y 250 µg/ml) evaluadas en el formato de ensayo de formación de puentes MSD empleando el formato de ensayo Panda. A. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para evaluar la recuperación del anticuerpo con diferentes niveles de fármaco, comparado con la línea de base sin fármaco. B. Porcentaje de recuperación con respecto a la línea de base. S/B: señal frente al fondo.

Descripción detallada

40 Los presentes inventores han desarrollado una nueva estrategia para detectar cualitativa y/o cuantitativamente ADAs a partir de una muestra, que es eficaz para reducir y eliminar los problemas de interferencia provocados por un fármaco o diana en la detección de ADAs. Empleando el principio de precipitación con PEG, la disociación con ácido, y el revestimiento sobre una superficie de alta capacidad en condiciones ácidas, los métodos descritos en la presente permiten la detección específica de ADA, así como de un fármaco o diana de un fármaco empleando un reactivo de detección específico. La estrategia puede aplicarse a aplicaciones más amplias para la reducción o la eliminación de la interferencia en inmunoensayos para ADA, PK/TK, y ensayos de biomarcadores (tales como de diana de fármacos), así como para ensayos de unión de ligandos, para la detección de anticuerpos neutralizantes.

45 Para un fármaco con una semivida larga y/o un fármaco administrado a un dosis alta o una dosis repetida, tal como una terapia basada en anticuerpos, los ADA habitualmente forman complejos inmunológicos circulantes con el fármaco, lo cual generalmente hace que los ADA no estén disponibles para la detección. Por ejemplo, un fármaco circulante puede interferir con la detección de ADAs y la diana del fármaco, o los ADAs pueden interferir con la detección y/o la cuantificación precisa de los niveles del fármaco para estudios farmacocinéticos ("PK") y/o toxicocinéticos ("TK"). La interferencia de fármacos de anticuerpos monoclonales, en especial de fármacos de IgG4 humana, presenta un reto adicional para el análisis de ADA, debido a su semivida más larga y dosis más altas. El impacto de esta interferencia es específico del método y la plataforma del inmunoensayo, y puede depender de los reactivos empleados en cada ensayo respectivo. El desarrollo de ensayos de inmunogenicidad tolerantes al fármaco resulta todavía más problemático cuando el propio fármaco es un producto terapéutico de anticuerpo humanizado.

50 Las estrategias más ampliamente adoptadas en uso en la actualidad aún presentan limitaciones de sincronización, sensibilidad o precisión debido a la presencia de factores de interferencia que son los mismos, o parecidos, a los que presentan los compañeros de unión en el ensayo de ligandos. Estas interferencias incluyen, pero no se limitan a, la

interferencia de fármacos en el ensayo de ADA, interferencia de ADA y/o diana del fármaco en el ensayo de PK, interferencia del fármaco en el ensayo de biomarcadores de dianas de fármacos, etc. El método de ADA que se emplea habitualmente es el ensayo de formación de puentes, en el que un ADA multivalente actúa de puente entre un fármaco de captura (no marcado, o marcado con biotina) y un fármaco de detección marcado. Este formato es susceptible de interferencia de fármaco endógena (ADA falso negativo) y/o interferencia de la diana del fármaco (ADA falso positivo). Siendo reconocido como uno de los mayores retos en el campo del desarrollo de métodos analíticos, se han empleado muchas estrategias para mitigar este problema, tales como la disociación con ácidos o bases, la inhibición competitiva de un 3^{er} compañero de unión, y/o la eliminación de los factores de interferencia, la extracción en fase sólida (SPEAD), ACE y muchos otros. El uso de la disociación con ácido en el tratamiento de las muestras, junto con un ensayo de formación de puentes, permite mejoras en la detección de ADAs en presencia de un fármaco, con una mayor sensibilidad del ensayo y recuperación de ADA. Esto mismo se observa generalmente con SPEAD y ACE, que normalmente permiten alguna mejora en la tolerancia al fármaco, pero la sensibilidad y la precisión relativa no se mantienen totalmente. Aunque el ácido (o la base) disocia el complejo inmunológico de ADA/fármaco, tras haber neutralizado la mezcla en las condiciones de ensayo, los complejos inmunológicos vuelven a formarse. En los ensayos de ADA que se emplean en la actualidad, la detección de ADA solo es posible si la producción de ADA excede a la cantidad de fármaco presente en el suero del paciente, debido a la formación de complejos de ADA-fármaco. Esta interferencia del fármaco conduce a subestimar el número de pacientes que producen ADA.

La inmunogenicidad de los productos farmacéuticos, en particular de las proteínas terapéuticas, es un problema importante en los estudios clínicos y preclínicos, puesto que puede inducir a efectos secundarios potencialmente graves, pérdida de eficacia, y cambios en la exposición al fármaco, lo cual complica la interpretación de los datos de toxicidad, farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD). A medida que aumenta el número de productos farmacéuticos con una semivida larga, tales como los anticuerpos monoclonales, la tolerancia al fármaco en los ensayos de ADA es un problema cada vez mayor. Para evaluar el potencial inmunogénico global de un fármaco, la cantidad total de ADA tiene gran importancia. Muchas técnicas que se emplean ampliamente para la detección de ADAs en el suero y en el plasma dependen de la unión específica del ADA a su fármaco diana a través del sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, los formatos de ensayo de formación de puentes se basan en la disponibilidad de sitios de unión al antígeno en los ADAs. Puesto que muchos de estos formatos de ensayo se basan en la disponibilidad de los sitios de unión al antígeno en los ADAs, solo pueden detectarse ADAs libres de fármacos o parcialmente libres de fármacos. Debido a que los materiales de ensayo específicos son escasos y el tiempo es un factor importante, resulta muy deseable un formato de ensayo con una mayor tolerancia al fármaco para la detección de ADAs en muestras biológicas.

La tolerancia al fármaco se define generalmente como la máxima cantidad de fármaco libre en una muestra que aún da como resultado una señal detectable de ADA. Se ha empleado el tratamiento de las muestras con ácido para mejorar la tolerancia al fármaco libre en ensayos de ADA. La unión del anticuerpo-antígeno (o fármaco) se debilita y finalmente se rompe mediante un pH bajo, lo cual permite detectar en muchos formatos de ensayo inmunogénicos (es decir, formatos de ensayo de formación de puentes) el ADA libre que se haya disociado de los ADAs parcial o completamente unidos al fármaco, mejorando de ese modo la tolerancia al fármaco. Sin embargo, tal como se demuestra en los ejemplos proporcionados en la presente, el tratamiento con ácidos solo no elimina la tolerancia al fármaco en los ensayos de ADA.

En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo-antígeno (o fármaco) se debilita y finalmente se rompe mediante un pH alto, lo cual permite detectar en muchos formatos de ensayo inmunogénicos, tras el tratamiento con una disolución básica, el ADA libre que se haya disociado de los ADAs parcial o completamente unidos al fármaco. Las características estructurales del fármaco biológico, tales como pl, o la presencia de ciertos enlaces de conjugación, dictarán si es más apropiada una disolución de ácido o una disolución de base para alterar la unión de ADA/fármaco. Para aumentar la tolerancia al fármaco y proporcionar un formato de ensayo de ADA mejorado, los presentes inventores han desarrollado métodos para determinar la presencia o ausencia de un ADA en una muestra con mayor tolerancia al fármaco. Los métodos contemplados en la presente incluyen una etapa de precipitación con polietilenglicol y una etapa de disociación con ácido.

Tal como se describe en la presente, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia o ausencia de un ADA en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica), comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una cantidad en exceso de fármaco al que se une el ADA, para formar complejos de fármaco/ADA, poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG), para formar un precipitado que comprende los complejos de fármaco/ADA, poner en contacto el precipitado con una disolución, para disociar los complejos de fármaco/ADA, inmovilizar sobre un sustrato los ADA disociados, y determinar la presencia o cantidad de dicho ADA. En otro aspecto, la etapa de determinación comprende poner en contacto los ADAs inmovilizados con un fármaco conjugado con un marcador detectable, y determinar la presencia o cantidad de dicho marcador detectable, para determinar de ese modo la presencia o ausencia de ADA en la muestra.

En una realización, el precipitado (complejos de fármaco/ADA) se pone en contacto con una disolución de ácido para disociar los complejos, y después se reviste sobre una gran superficie (en condiciones ácidas para mantener separados el fármaco y los ADA) o un sustrato (por ejemplo, una placa de carbono de alto potencial de unión con una alta capacidad de revestimiento) durante un tiempo suficiente para permitir el revestimiento de todos los fármacos libres y ADAs libres disociados. El entorno ácido evita que los complejos vuelvan a formarse, mientras están

inmovilizados sobre la superficie del sustrato. Cuando se emplea una disolución de ácido para disociar los complejos, el ensayo puede denominarse un ensayo PandA (PEG y ácido).

5 En otra realización, el precipitado final (complejos de fármaco/ADA) se reconstituye con una disolución básica para disociar los complejos, y después se reviste sobre una gran superficie (en condiciones básicas para mantener separados el fármaco y los ADA) o un sustrato (por ejemplo, una placa de carbono de alto potencial de unión con una alta capacidad de revestimiento) durante un tiempo suficiente para permitir el revestimiento de todos los fármacos libres y ADAs libres disociados. El entorno básico evita que los complejos vuelvan a formarse mientras están inmovilizados sobre la superficie del sustrato.

10 La selección de una disolución ácida o básica dependerá de los parámetros del fármaco (por ejemplo, el fármaco biológico), tales como el pI, o la presencia de ciertos enlaces de conjugación, y la selección deberá tener un efecto mínimo sobre la integridad y la estructura del fármaco.

15 La presente invención también se refiere a métodos para reducir la interferencia en un ensayo de PK/TK de fármacos debida a la presencia de un ADA en una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una cantidad en exceso de un ADA para formar complejos de fármaco/ADA, poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG), para formar de ese modo un precipitado que comprende los complejos de fármaco/ADA, poner en contacto el precipitado con una disolución de ácido, disociando de ese modo los complejos de fármaco/ADA, inmovilizar sobre una superficie y/o sustrato el fármaco libre y el ADA libre disociados, y realizar el ensayo de PK/TK del fármaco empleando un reactivo de detección específico contra el fármaco, para así reducir la interferencia del ADA. El ensayo de fármacos puede ser, por ejemplo, un ensayo de cuantificación de fármacos, un ensayo de PK/TK de fármacos, o un ensayo de potencia de fármacos. Puede aplicarse un principio similar al método para la cuantificación de una diana farmacéutica como un ensayo de biomarcadores para determinar la seguridad y la eficacia de fármaco (PD) en presencia de interferencia del fármaco. Se añade un fármaco en exceso a la muestra para formar el complejo de diana del fármaco/fármaco. Se usan etapas de precipitación con PEG y disociación con ácidos (o disociación con bases), y después se usa un reactivo de detección específico de la diana del fármaco.

25 En algunos aspectos, la descripción proporciona métodos para determinar la presencia o ausencia de un ADA dirigido contra un fármaco. El término "fármaco" o la expresión "material de fármaco", tal como se emplean en la presente, se refieren a una sustancia química que tiene efectos medicinales, potenciadores de la actuación, y/o intoxicantes cuando se introduce en el cuerpo de un ser humano u otro animal. Por ejemplo, el fármaco puede ser un compuesto de molécula pequeña orgánico o inorgánico, o una sustancia terapéutica biológica (por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de fármaco) o uno de sus fragmentos, sustancias bioterapéuticas de múltiples dominios, un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético, un carbohidrato o un lípido), con la condición de que el fármaco sea inmunogénico y sea capaz de suscitar una respuesta inmunológica. La expresión "anticuerpo de fármaco" indica un anticuerpo que puede administrarse a un individuo para el tratamiento de una enfermedad y, tal como se emplea en la presente, distingue a estos anticuerpos de los ADAs. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos de fármacos incluyen, por ejemplo, un anticuerpo seleccionado de muromomab-CD3, abciximab, rituximab, daclizumab, basiliximab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, etanercept, gemtuzumab, fresolimumab, alemtuzumab, ibritomomab, adalimumab, alefacept, omalizumab, tofacitinib, tositumomab, efalizumab, cetuximab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, panitumumab, eculizumab, mepolizumab, necitumumab, blinatumomab, nivolumab, dinutuximab, secukinumab, evolocumab, pembrolizumab, ramucirumab, vedolizumab, siltuximab, opinutuzumab, adotrastuzumab, emtansina, raxibacumab, pertuzumab, brentuximab, belimumab, ipilimumab, denosumab, tocilizumab, ofatumumab, canakinumab, golimumab, ustekinumab, catumaxomab, y certolizumab.

45 Los métodos descritos en la presente pueden comprender una etapa de precipitación mediada por polietilenglicol ("PEG"), que comprende poner en contacto una muestra con un compuesto de PEG. El compuesto de PEG puede ser un compuesto de PEG que tenga un peso molecular entre 1.000 y 40.000 daltons. Por ejemplo, el compuesto de PEG comprende al menos un PEG seleccionado del grupo que consiste en PEG1000, PEG1450, PEG3000, PEG6000, PEG8000, PEG10000, PEG14000, PEG15000, PEG20000, PEG250000, PEG30000, PEG35000, y PEG40000.

50 La concentración específica de PEG se selecciona para maximizar el equilibrio entre especificidad y selectividad. La cantidad de PEG que se pone en contacto con la muestra puede corresponder a una concentración de entre alrededor de 0,1% y alrededor de 10,0%, alrededor de 0,2% y alrededor de 7,0%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 6,0%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 5,0%, entre alrededor de 1,5% y alrededor de 5,5%, entre alrededor de 2,0% y alrededor de 5,0%, entre alrededor de 3,0% y alrededor de 4,5%, entre alrededor de 3,5% y alrededor de 4,0%, entre alrededor de 1,0% y alrededor de 2,5%, entre alrededor de 1,2% y alrededor de 1,5%, alrededor de 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% o alrededor de 10,0% de PEG.

55 Los métodos pueden comprender una etapa de disociación con ácido, que comprende poner en contacto un precipitado con un ácido. El ácido puede ser o puede incluir un ácido orgánico. Como alternativa, o además, el ácido puede ser o puede incluir un ácido inorgánico. El ácido empleado en la etapa de disociación puede comprender una mezcla de un ácido orgánico y un ácido inorgánico. Los ejemplos no limitantes de ácidos orgánicos incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glutámico, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico, ácido trifluoroacético, ácido bencenosulfónico, ácido aminometanosulfónico, ácido canfo-10-sulfónico, ácido

cloroacético, ácido bromoacético, ácido yodoacético, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido glicérico, ácido succínico, ácido málico, ácido aspártico, y sus combinaciones. Los ejemplos no limitantes de ácidos inorgánicos incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, y sus mezclas.

- 5 La cantidad de un ácido puede corresponder a una concentración de entre alrededor de 0,01M y alrededor de 10M, entre alrededor de 0,1M y alrededor de 5M, de alrededor de 0,1M y alrededor de 2M, entre alrededor de 0,2M y alrededor de 1M, o entre alrededor de 0,25M y alrededor de 0,75M de un ácido o una mezcla de ácidos. En algunos casos, la cantidad de un ácido corresponde a una concentración mayor o igual que alrededor de 0,01M, 0,05M, 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,7M, 0,8M, 0,9M, 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M, 9M, o 10M de un ácido o una
10 mezcla de ácidos. El pH del ácido puede ser, por ejemplo, alrededor de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, o 6,5.

- Los métodos pueden comprender una etapa de disociación con bases, que comprende poner en contacto un precipitado con una base. La base puede ser o puede incluir una base orgánica. Como alternativa, o además, la base puede ser o puede incluir una base inorgánica. La base utilizada en la etapa de disociación puede comprender una
15 mezcla de una base orgánica y una base inorgánica. Los ejemplos no limitantes de bases incluyen, por ejemplo, urea, hidróxido de sodio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de calcio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario, hidróxido de cinc, hidróxido de litio, acetona, metilamina, y amoniaco, y sus mezclas.

- Cuando se emplea una disolución básica para alterar la interacción de ADA/fármaco, la cantidad de base puede corresponder a una concentración de entre alrededor de 0,01M y alrededor de 5M, entre alrededor de 0,1M y alrededor
20 de 5M, alrededor de 0,1M y alrededor de 1M, entre alrededor de 0,2M y alrededor de 1M, o entre alrededor de 0,25M y alrededor de 0,75M de una base o una mezcla de bases. En algunos casos, la cantidad de una base corresponde a una concentración mayor o igual que alrededor de 0,01M, 0,05M, 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,7M, 0,8M, 0,9M, 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M, 9M, o 10M de una base o una mezcla de bases. El pH de la base puede ser, por ejemplo, alrededor de 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5 y 13,0.

- 25 En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto con un ácido o una base durante una cantidad de tiempo suficiente para disociar los complejos de fármaco/ADA preformados. En ciertos casos, la muestra se pone en contacto (por ejemplo, se incuba) con un ácido o una base durante un periodo de tiempo que varía de alrededor de 0,1 horas a alrededor de 24 horas, por ejemplo de alrededor de 0,2 horas a alrededor de 16 horas, de alrededor de 0,5 horas a alrededor de 10 horas, de alrededor de 0,5 horas a alrededor de 5 horas, o de alrededor de 0,5 horas a alrededor de 2
30 horas. En otros casos, la muestra se pone en contacto (por ejemplo, se incuba) con un ácido o una base durante un periodo de tiempo que es mayor o igual que alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 horas. La muestra puede ponerse en contacto con un ácido o una base a cualquier temperatura que sea en general compatible con el método, por ejemplo 4°C, temperatura ambiente (TA), o 37°C. La TA puede ser, por ejemplo, 22°C a 26°C, por ejemplo 23°C, 24°C o 25°C.

- 35 Los métodos pueden comprender inmovilizar sobre una superficie y/o un sustrato un ADA y/o fármaco disociado. El sustrato puede comprender una superficie de carbono, una superficie de vidrio, una superficie de sílice, una superficie metálica, una superficie revestida con un material polimérico, una superficie que contiene un revestimiento metálico o químico, una membrana, microperlas, o una matriz polimérica porosa. El sustrato puede comprender una superficie de carbono porosa. En una realización ejemplar, el sustrato es una placa de carbono de alto potencial de unión que tiene
40 una gran superficie y una alta capacidad de revestimiento.

- Los métodos pueden comprender además determinar la presencia o cantidad de un ADA, o la presencia o cantidad de un fármaco en la muestra. Así, la descripción proporciona anticuerpos, anticuerpos antifármaco, o un fármaco marcado con un marcador detectable. Los ejemplos no limitantes de marcadores detectables para cualquiera de los métodos de la invención incluyen un hapteno, una enzima, un sustrato enzimático, un inhibidor de enzimas, un fluoróforo, un cromóforo, marcadores luminiscentes, radioisótopos (que incluyen radionúclidos), y un miembro de una pareja de
45 unión. La intensidad del marcador detectable puede medirse empleando instrumentos y dispositivos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, un fluorómetro portátil o de sobremesa (por ejemplo, un fluorómetro manual) o un colorímetro portátil o de sobremesa (por ejemplo, un colorímetro manual).

- En algunas realizaciones, el marcador detectable es un marcador electroquimioluminiscente, incluyendo, por ejemplo,
50 un marcador Sulfo-TAG®.

- El marcador detectable puede ser un miembro específico (un primer miembro o un segundo miembro) de una pareja de unión. Las parejas de unión para uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, por ejemplo, biotina/estreptavidina, biotina/avidina, biotina/neutravidina, biotina/captavidina, epítipo/anticuerpo, proteína A/inmunoglobulina, proteína G/inmunoglobulina, proteína L/inmunoglobulina, GST/glutamina, etiqueta de His/níquel, antígeno/anticuerpo, FLAG/anticuerpo M1, proteína de unión a maltosa/maltosa, proteína de unión a calmodulina/calmodulina, enzima-sustrato de enzima, y parejas de unión de receptor-ligando. En algunas realizaciones, la proteína de unión a GlcNac se conjuga con un primer miembro de una pareja de unión (por ejemplo, biotina, avidina, neutravidina, captavidina, anticuerpo, antígeno, proteína A, proteína G, proteína L, GST, etiqueta de His, FLAG, MBP, proteína de unión a calmodulina, una enzima, una receptor o un ligando).
55

Tal como se emplean en la presente, la expresión “marcador de fluorescencia” y el término “fluoróforo” se emplean de modo intercambiable, e indican cualquier sustancia que emite energía electromagnética, tal como luz a una cierta longitud de onda (longitud de onda de emisión) cuando la sustancia se ilumina por radiación de una longitud de onda diferente (longitud de onda de excitación), y pretenden incluir una molécula química o bioquímica, o sus fragmentos, que es capaz de interactuar o reaccionar específicamente con un analito de interés en una muestra para proporcionar una o más señales ópticas.

Los fluoróforos representativos para su uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, por ejemplo, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente azul, proteína fluorescente roja, fluoresceína, 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), tintes de cianina (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7), tintes Bodipy (Invitrogen) y/o tintes Alexa Fluor (Invitrogen), dansilo, cloruro de dansilo (DNS-C1), 5-(yodoacetamida)fluoresceína (5-IAF, 6-acrilóil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodano), cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD-CI), bromuro de etidio, Amarillo Lucifer, tintes de rodamina (hidrocloruro de 5-carboxirrodamina 6G, cloruro de lisamina-rodamina B-sulfonilo, isotiocianato de rodamina-B (RITC (isotiocianato de rodamina-B), rodamina 800); 5-(y 6-)isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)), Rojo Texas™, cloruro de sulfonilo, ácidos naftalaminsulfónicos, incluyendo, pero no se limitan a, ácido 1-anilino-naftalen-8-sulfónico (ANS) y ácido 6-(p-toluidinil)naftalen-2-sulfónico (TNS), ácido graso de antroílo, DPH, ácido parinámico, TMA-DPH, ácido graso de fluorenilo, fluoresceína-fosfatidiletanolamina, Rojo Texas-fosfatidiletanolamina, pirenilo-fosfatidilcolina, fluorenilo-fosfatidilcolina, merocianina 540, naftilestirilo, 3,3'-dipropiltiadicarbocianina (diS-C3-(5)), 4-(p-dipentilaminoestiril)-1-metilpiridinio (di-5-ASP), Cy-3 yodoacetamida, Cy-5-N-hidroxisuccinimida, Cy-7-isotiocianato, IR-125, naranja de tiazol, azul B, Azul del Nilo, Al ftalocianina, oxaxina 1,4',6'-diamidino-2-fenilindol. (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, naranja de acridina, homodímero de etidio, N-(etoxicarbonilmetil)-6-metoxiquinolinio (MQAE), Fura-2, verde de calcio, carboxi SNARF-6, BAPTA, cumarina, fitofluoros, coroneno y complejos de metal-ligando.

Los haptenos para su uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, por ejemplo, digoxigenina, y biotina.

Las enzimas para su uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), peroxidasa de soja (SBP), ureasa, beta-lactamasa y glucosa oxidasa.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona kits que están adaptados para determinar la presencia o ausencia de ADA en una muestra biológica. Los kits pueden comprender instrucciones y, en un recipiente, reactivos para poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG), para formar un precipitado que comprende complejos de fármaco/ADA, y reactivos para poner en contacto el precipitado con una disolución de ácido para disociar los complejos de fármaco/ADA; y un sustrato adecuado para inmovilizar los ADAs o el fármaco disociados para posteriores análisis.

Ejemplos

La invención se describe más a fondo en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Los siguientes ejemplos describen nuevos métodos de ensayo de ADA en los que se obtuvo una recuperación completa de un anticuerpo en el límite de cuantificación, a pesar de la presencia de niveles elevados de la sustancia terapéutica de anticuerpo. De modo específico, se proporcionan tres casos de estudio para demostrar la eliminación de la interferencia del fármaco en ensayos de ADA para sustancias terapéuticas de anticuerpos monoclonales (fármacos A, B y C).

1.1 Formato de ensayo

Para mejorar la tolerancia al fármaco (o eliminar la interferencia del fármaco) de ensayos de inmunogenicidad convencionales, los inventores buscaron desarrollar un nuevo método para determinar la presencia o cantidad de un ADA en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica). Los inventores han desarrollado con éxito un nuevo método en el que se obtuvo una recuperación completa de un anticuerpo antifármaco en el límite de cuantificación, a pesar de la presencia de niveles elevados del fármaco (la sustancia terapéutica de anticuerpo). En la FIG. 1 se muestra una representación esquemática de una realización ejemplar del método.

Tal como se muestra en la FIG. 1, se añade un exceso de material de fármaco a una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) para permitir la formación de los complejos de fármaco/ADA. Después de la incubación inicial, se añade PEG a cada muestra, y se incuba para permitir la precipitación de los complejos. Después de una serie (por ejemplo, uno o más) de lavados, el precipitado se reconstituye con una disolución de ácido para disociar los complejos de fármaco/ADA. Los complejos de fármaco/ADA disociados se revisten sobre un sustrato (es decir, se revisten sobre los pocillos de una placa de alto potencial de unión MSD). Después de la incubación, el sustrato se bloquea, y después se realiza la detección empleando el fármaco marcado con un marcador detectable, que permite la detección de ADA mediante ECL (“electroquimioluminiscencia” o “quimioluminiscencia potenciada”).

En un aspecto, el método mostrado en la FIG. 1 comprende añadir un exceso de material de fármaco a las muestras, para saturar el anticuerpo libre, formando por lo tanto los complejos de fármaco/ADA. Los complejos se precipitan

después empleando PEG. El PEG se añade a la muestra a una concentración optimizada, para lograr la sensibilidad deseada, al mismo tiempo que se mantiene la especificidad. Después de una serie de lavados, el precipitado final se reconstituye con una disolución de ácido y se reviste sobre una placa de carbono de alto potencial de unión. El entorno ácido evita que los complejos vuelvan a formarse mientras están adsorbidos sobre la superficie de carbono porosa de la placa de alto potencial de unión MSD. Entonces se realiza la detección de los niveles totales de ADA empleando el fármaco conjugado a un marcador Sulfo-TAG®, seguido de una lectura de electroquimioluminiscencia en un lector Meso Scale Discovery® Sector 2400.

1.2 Materiales experimentales

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos, el fármaco Sulfo-TAG®, y el anticuerpo antifármaco de conejo purificado por afinidad fueron desarrollados por Genzyme, una empresa de Sanofi Company (Framingham, MA). Las reacciones de suero humano sin tratamiento previo procedentes de individuos sanos se obtuvieron en Bioreclamation Inc. Las muestras de suero de la línea de base de enfermedad se obtuvieron a partir de sujetos sin exponer al tratamiento enrolados en ensayos clínicos relacionados con el producto. Las placas de 96 pocillos High Bind Meso Scale, el marcador Sulfo Tag, el amortiguador de lectura T, y el lector Sector 2400 se obtuvieron en Meso Scale Discovery® ("MSD"). El PEG8000 se obtuvo en TekNova. El ácido acético glacial fue proporcionado por J.T Baker. Tween 20 y la leche en polvo desnatada-Sigma se adquirieron en Aldrich. El lavador de placas ELx405 fue suministrado por Biotek. El amortiguador de lavado de placas se obtuvo de PerkinElmer. Las placas de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno transparente se obtuvieron de Corning. La seroalbúmina bovina se obtuvo de Seracare. El borato se obtuvo a través de Sigma Aldrich, nº de catálogo B0394.

El fármaco A es un anticuerpo agotador de IgG1 humanizado que se une a una diana de la superficie celular de linfocitos para una enfermedad autoinmunitaria. El fármaco B es una IgG4 totalmente humanizada que neutraliza una citocina soluble uniéndose a su receptor de la superficie celular en el tejido diana para una indicación de fibrosis. El fármaco C es una IgG4 humanizada que reconoce una molécula de adhesión de la superficie celular y bloquea su unión a un ligando soluble.

1.3 Procedimiento de inmunoensayo de formación de puentes sin disociación con ácidos

El formato de ensayo de formación de puentes de MSD requiere que el fármaco se marque con biotina y se marque con el marcador Sulfo-TAG®. Según el formato de ensayo de MSD, el fármaco biotinilado servirá como la molécula de captura, y el fármaco marcado con Sulfo-TAG® será el informador en el ensayo de formación de puentes.

Las muestras se diluyen inicialmente 1:10 en amortiguador de ensayo (ácido acético 300 mM, BSA al 2%). Las muestras se añaden a una placa de polipropileno en pocillos por duplicado, y se añade una disolución que contiene concentraciones equimolares de biotina-fármaco y Sulfo-TAG-fármaco en amortiguador de ensayo. La placa se incuba entonces durante 2 horas en un agitador a 22-26°C a 450 rpm. Una placa de MSD revestida con estreptavidina se bloquea con amortiguador de ensayo durante un mínimo de una hora. Tras la incubación, la placa de MSD se lava 3 veces y se transfieren 50 µl de la mezcla incubada desde la placa de polipropileno a la placa de MSD y se incuban durante 2 horas en un agitador a 22-26°C. Tras la incubación, la placa se lava, y se añade una disolución del amortiguador de lectura T de MSD que contiene tripropilamina, y la placa se lee en el formador de Sector Imager 2400 de MSD.

Se aplica un voltaje en el instrumento. En presencia de tripropilamina, el Sulfo-TAG® participa en una reacción electroquimioluminiscente (ECL). Los anticuerpos que actúan de puente entre Sulfo-TAG-fármaco y biotina-fármaco unidos a la superficie de estreptavidina producirán una señal de ECL. Tras la incubación final, la placa se lava con Tween al 0,05% en PBS. Entonces se añade amortiguador de lectura T 2x, y la placa se lee en un Sector PR2400. La señal electroquimioluminiscente es proporcional al anticuerpo antifármaco en cada muestra. Los resultados de las muestras se convierten en una relación de señal frente al fondo (S/B) dividiendo la señal promedio de ECL de una muestra individual entre la señal promedio de ECL del control negativo.

1.4 Procedimiento de inmunoensayo de formación de puentes con disociación con ácidos

Las muestras se diluyen inicialmente 1:10 en amortiguador de ensayo (ácido acético 300 mM, BSA al 2%) y se incuban a 22-26°C durante 45 minutos. Después, las muestras se añaden a una placa de polipropileno en pocillos por duplicado, y se añade una disolución que contiene concentraciones equimolares de biotina-fármaco y Sulfo-TAG-fármaco en amortiguador de ensayo, además de Tris HCl, en una relación para neutralizar con eficacia el pH hasta 7,0. La placa se incuba entonces durante 2 horas en un agitador a 22-26°C a 450 rpm. Una placa de MSD revestida con estreptavidina se bloquea con amortiguador de ensayo durante un mínimo de una hora. Tras la incubación, la placa de MSD se lava 3 veces, y se transfieren 50 µl de la mezcla incubada desde la placa de polipropileno a la placa de MSD y se incuban durante 2 horas en un agitador a 22-26°C. Tras la incubación, la placa se lava, y se añade una disolución del amortiguador de lectura T de MSD que contiene tripropilamina, y la placa se lee en el Sector Imager 2400 de MSD.

Se aplica un voltaje en el instrumento. En presencia de tripropilamina, el Sulfo-TAG® participa en una reacción electroquimioluminiscente (ECL). Los anticuerpos que actúan de puente entre Sulfo-TAG-fármaco y biotina-fármaco unidos a la superficie de estreptavidina producirán una señal de ECL. Tras la incubación final, la placa se lava con

Tween al 0,05% en PBS. Después, se añade amortiguador de lectura T 2x, y la placa se lee en un Sector PR2400. La señal electroquimioluminiscente es proporcional al anticuerpo antifármaco en cada muestra. Los resultados de las muestras se convierten en una relación de señal frente al fondo (S/B) dividiendo la señal promedio de ECL de una muestra individual entre la señal promedio de ECL del control negativo..

5 1.5 Procedimiento 1 de PEG y ácido (PandA)

Las muestras se diluyen inicialmente 1/5 en amortiguador de ensayo (ácido acético 300 mM, BSA al 2%) que contiene un exceso de fármaco (10-50 µg/ml), y se incuban durante una hora a 37°C con 450 rpm en una placa de polipropileno para permitir que se formen complejos entre el fármaco y cualquier anticuerpo libre que aún quede en la muestra. A eso le sigue la adición de PEG al 3% en borato, pH 8,0, a cada muestra, y una incubación durante la noche a 2-8°C. La concentración final del amortiguador de PEG en cada muestra es 1,5%.

Al día siguiente, la placa se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos para precipitar los complejos en un pelete. El pelete se resuspende entonces con PEG al 1,5% en borato, pH 8,0, y se centrifuga por segunda vez a 4000 rpm durante 20 minutos. El ciclo de lavado se repite tres veces. Después de la centrifugación final, cada muestra se suspende en 100 µl de ácido acético 300 mM, y se vuelve a diluir 1/10 (20 µl de muestra + 180 µl de ácido acético) para lograr una dilución final de la muestra de 1/50. Las muestras diluidas se revisten entonces añadiendo 25 µl por duplicado a los pocillos de una placa de alto potencial de unión de MSD, y se incuban durante una hora a 24°C agitando a 450 rpm. Tras la incubación, la placa se lava con 1x amortiguador de lavado de placas, y se bloquea con leche al 3% en PBS durante una hora a 24°C con agitación, tras lo cual la placa se lava y se añaden 100 ng/ml de Sulfo-TAG-fármaco a las muestras y se incuban durante una hora a 24°C con agitación. Después de la incubación final, la placa se lava con Tween al 0,05% en PBS. Entonces se añade amortiguador de lectura T 2x, y la placa se lee en un Sector PR2400. La señal electroquimioluminiscente es proporcional al anticuerpo antifármaco en cada muestra.

En algunas realizaciones, la etapa de incubación después de la adición inicial de ácido puede realizarse a 23°C, 25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C o mayor.

En algunas realizaciones, tras la etapa de precipitación final, cada muestra puede diluirse aún más hasta una dilución final de muestra de, por ejemplo, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:50, o 1:60, 1:80, 1:100, o 1:200. Generalmente, la dilución final de la muestra será < 1:100, que es la dilución mínima requerida (MRD) establecida por la Food and Drug Administration (FDA).

1.5 Procedimiento 2 de PEG y ácido (PandA)

Las muestras se diluyen inicialmente 1/5 en amortiguador de ensayo (ácido acético 300 mM, BSA al 2%) que contiene un exceso de fármaco (10-50 µg/ml) y se incuban durante una hora a 24°C con 450 rpm en una placa de polipropileno, para permitir que se formen complejos entre el fármaco y cualquier anticuerpo libre que aún quede en la muestra. A esto le sigue la adición de una disolución de PEG en una relación 1:1 de PEG:muestra a cada muestra y una incubación durante la noche a 2-8°C. La concentración final de PEG se optimizó para cada producto para que fuera la óptima para la precipitación de complejos específicos y lograr la especificidad y la sensibilidad deseadas, al mismo tiempo que se minimiza el efecto de las moléculas no complejadas, tales como IgG no específicas. Las concentraciones de PEG añadidas a las muestras estaban entre 3% y 6% (3% para el fármaco A, y 6% para los fármacos B y C añadidos a una relación 1:1 a las muestras diluidas).

Al día siguiente, la placa se centrifuga a 4000 rpm durante 30 minutos para precipitar los complejos en un pelete. El pelete se resuspende entonces con PEG en PBS y se centrifuga por segunda vez a 4000 rpm durante 20 minutos. El ciclo de lavado se repite una vez más. Después de la centrifugación final, cada muestra se resuspende y se diluye en ácido acético 300 mM para lograr el MRD final deseado para el ensayo concreto (1/50 para los fármacos A y C, y 1/25 para el fármaco B). Las muestras se revisten entonces en pocillos por duplicado de una placa de alto potencial de unión MSD. La placa se incuba entonces durante una hora a 24°C con agitación a 450 rpm. Después de la incubación, la placa se lava con 1x amortiguador de lavado de placas y se bloquea con leche al 3% en PBS durante una hora a 24°C con agitación. Entonces, la placa se lava, y se añade a las muestras una disolución que contiene Sulfo-TAG-fármaco, y se incuba durante una hora a 24°C con agitación. Después de la incubación final, la placa se lava con 1x amortiguador de lavado de placas. Después, se añade el amortiguador de lectura T 2x, y la placa se lee en un Sector PR2400. La señal electroquimioluminiscente es proporcional al anticuerpo antifármaco en cada muestra.

En algunas realizaciones, la etapa de incubación después de la adición inicial de ácido puede realizarse a 23°C, 25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C o mayor.

En algunas realizaciones, tras la etapa de precipitación final, cada muestra puede diluirse aún más hasta una dilución final de muestra de, por ejemplo, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:50, o 1:60, 1:80, 1:100, o 1:200. Generalmente, la dilución final de muestra será < 1:100, que es la dilución mínima requerida (MRD) establecida por la Food and Drug Administration (FDA).

55 2.1 Fármaco A

Evaluación de la sensibilidad y la tolerancia al fármaco

Para el fármaco A, el método PandA se comparó con el ensayo de formación de puentes de MSD tradicional con y sin disociación con ácidos para mejorar la tolerancia al fármaco. La sensibilidad y la tolerancia al fármaco del ensayo se determinaron empleando anticuerpo antifármaco de conejo purificado por afinidad a concentraciones que varían de 8 $\mu\text{g/ml}$ a 125 ng/ml con y sin el fármaco (fármaco A) a diversas concentraciones (0, 0,1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) en el formato de ensayo de formación de puentes de MSD con (FIG. 2A-B) y sin (FIG. 3A-B) disociación con ácidos. Las muestras que contenían ADA y fármaco se prepararon en sueros humanos normales reunidos, y se incubaron durante al menos una hora a 37°C para permitir que se formasen los complejos de fármaco/ADA antes del ensayo.

El punto de corte se determinó evaluando 40 muestras de suero humano normal, calculando la media y la desviación estándar para las muestras, y calculando el factor del 95° percentil de 1,645 veces la desviación estándar y sumándolo a la media, tal como se recomienda generalmente. Para el fármaco A, el nuevo método se comparó con el ensayo de formación de puentes tradicional con y sin disociación con ácidos para la tolerancia al fármaco.

La FIG. 2 es un resumen de los datos que comparan el formato de ensayo de formación de puentes de MSD sin disociación con ácido. Los resultados indican una fuerte respuesta a la dosis para la detección de ADA en ausencia de fármaco, y se observa inhibición con 1 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco. (FIG. 2A) La figura 2B indica unas recuperaciones bajas de detección de anticuerpo, aproximadamente 10% a 125 ng/ml de ADA a la concentración más baja de fármaco ensayada de 1 $\mu\text{g/ml}$. (FIG. 2B) La sensibilidad del ensayo se reduce de 15 ng/ml en ausencia del fármaco hasta 342 ng/ml con 1 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco. La sensibilidad en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de fármaco se redujo a 5143 ng/ml o 5,1 $\mu\text{g/ml}$.

La FIG. 3 es un resumen de los datos del formato de ensayo de formación de puentes de MSD con disociación con ácido. Los resultados indican una respuesta a la dosis similar al ensayo de formación de puentes sin ácido para la detección de ADA en ausencia de fármaco, y se observa inhibición con 1 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco. (FIG. 3A) Los porcentajes de recuperación permanecen aceptables con 1 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco, pero se reducen hasta 35% a 125 ng/ml de ADA a 10 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco, que es menor que la C_{max} del fármaco. (FIG. 3B) La sensibilidad de detección del ensayo se mantuvo para 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco a alrededor de 15 ng/ml , mientras que se encontró que era 262 ng/ml en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de fármaco. Aunque la sensibilidad del ensayo cumple con algunas de las directrices propuestas de 250-500 ng/ml en este método, este descubrimiento es específico de esta combinación de producto y anticuerpo, y puede no ser aceptable para otros productos o con diferentes controles de anticuerpos.

Las FIG. 4A y 4B son un resumen de los datos para el formato de precipitación de PandA (Procedimiento 2). Los resultados indican una respuesta a la dosis aceptable en ausencia de fármaco, y no se observa inhibición significativa debida al fármaco presente en las muestras. (FIG. 4A) Los porcentajes de recuperación permanecen aceptables sobre todo entre 80-120%, independientemente de la cantidad de fármaco presente en las muestras, cuando se compara con los resultados de las muestras sin fármaco como referencia. (FIG. 4B) De modo similar, la sensibilidad de detección del ensayo se mantuvo en 9-14 ng/ml a pesar del fármaco presente a 100 $\mu\text{g/ml}$, que es 3-4 veces mayor que la C_{max} esperada del fármaco A.

La tabla 1 es un resumen de las sensibilidades de ensayo para la detección de ADA a diversas concentraciones de fármaco A ensayadas en cada uno de los métodos ensayados. Las concentraciones de sensibilidad del ensayo se obtuvieron por retroajuste del punto de corte de S/B de cada curva de anticuerpo mostrada en FIGs. 2A, 3A y 4A. ADA: anticuerpo antifármaco; S/B: señal frente al fondo.

Tabla 1.

Fármaco ($\mu\text{g/ml}$)	Sensibilidad del ensayo ng/ml		
	Ensayo de formación de puentes sin disociación con ácidos	Ensayo de formación de puentes con disociación con ácidos	Método PandA
0	15	15	10
1	342	8	13
10	393	16	9
100	5143	262	14

Tal como se muestra en la Tabla 1, el método PandA no solo mejoró la tolerancia al fármaco, sino que también mantiene la sensibilidad del ensayo en 9-14 ng/ml , a pesar de la presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco. La recuperación de detección del anticuerpo permanece mayoritariamente entre 80 y 120%, independientemente de la cantidad de fármaco presente en la muestra, que es mayor que en el inmunoensayo de formación de puentes con disociación con ácidos.

Comparación de los resultados de titulación

El método PandA también puede emplearse para dar a conocer de forma precisa las titulaciones de anticuerpos en presencia de un fármaco. Para determinar si los títulos del criterio de valoración se correlacionan entre las muestras que contienen anticuerpo solo (0 µg/ml de fármaco) y otras que contienen una cantidad equivalente de anticuerpo pero una mayor concentración de fármaco (100 µg/ml de fármaco), se analizaron muestras de ensayo en el método en el que se realizaron diluciones para la titulación siguiendo dos esquemas de titulación diferentes. El primer esquema incorpora una titulación antes de la precipitación con PEG, y el segundo esquema incorpora la titulación antes del revestimiento sobre las placas de alto potencial de unión. Las titulaciones del criterio de valoración fueron idénticas entre las muestras que contienen fármaco y las que no lo contienen al mismo nivel de anticuerpo, así como entre los esquemas de titulación basados en el valor de punto de corte de titulación del ensayo (S/B de 1,2). Los datos de titulación del criterio de valoración se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2.

Muestra	A		B	
Nivel de fármaco µg/ml	100	0	100	0
Titulación (diluido pre-PEG)	1600	1600	400	400
Titulación (diluido post-PEG)	1600	1600	200	400

3.1. Placas de alto potencial de unión MSD (lote a lote) y precisión global

Para determinar si las placas de alto potencial de unión MSD contribuyen a la variabilidad del ensayo, se llevó a cabo el revestimiento de las muestras en tres lotes diferentes. Los datos se representaron gráficamente y se analizaron para la equivalencia empleando ANOVA.

Para determinar si las placas de alto potencial de unión MSD contribuyen a la variabilidad del ensayo, se llevó a cabo el revestimiento de las muestras en tres lotes diferentes de placas MSD. Las muestras contenían anticuerpo de conejo purificado por afinidad, con diversas concentraciones de fármaco. La S/B observada se representó gráficamente frente a la concentración de ADA para cada uno de los tres lotes de placas, como se muestra en FIG. 5. Se encontró que la precisión entre los lotes de placas era aceptable con CV menor que 20% (Tabla 3), y ANOVA mostró que no había diferencias significativas entre los tres lotes, con un valor p de 0,1776.

4.1 Fármaco B

Interferencia de la diana en el ensayo de formación de puentes de MSD con disociación con ácidos

Para el fármaco B, se observó un problema específico en el ensayo de formación de puentes de MSD con disociación con ácidos, puesto que la diana para el fármaco B cambia de un monómero a un dímero a pH bajo, provocando resultados falsos positivos. El efecto de la dimerización se observa en 100% de las muestras de suero normales y las muestras de la línea de base de enfermedad en el ensayo de formación de puentes de MSD con disociación con ácidos. Este fenómeno es similar al indicado por Dai et al. [Dai S., Schantz A., Clements-Egan A., Cannon M., Shankar G.: Development of a method that eliminates false-positive results due to nerve growth factor interference in the assessment of fulranumab immunogenicity, AAPS J., 16(3), 464-477 (2014)], en el que se encontró que la elevada incidencia aparente de anticuerpos antifármaco (ADA) en los estudios de fase 1 fue el resultado de la detección de la diana del fármaco, un homodímero, debido a su capacidad para formar puentes entre las moléculas de fármaco. Dai et al. descubrieron que el pretratamiento de las muestras basado en la disociación con ácidos, empleado para mitigar la interferencia del fármaco, aumentó notablemente la interferencia de la diana del fármaco.

Para demostrar el efecto de la dimerización de la diana endógena de la diana del fármaco debido a la disociación con ácidos y los resultados falsos positivos en el ensayo, se analizaron muestras de suero normales (n = 32) y de la línea de base de enfermedad (n = 16) en el ensayo de formación de puentes con y sin disociación con ácidos, para destacar el efecto de la dimerización de la diana endógena debido a la disociación con ácidos y los resultados falsos positivos en el ensayo.

La FIG. 6 es una representación de las muestras de suero normales ensayadas en el ensayo de formación de puentes de MSD con y sin disociación con ácidos. Se observa una distribución normal en el fondo o cerca del fondo del ensayo (población a la izquierda) en el conjunto no tratado con ácido, mientras que se observaron algunos resultados positivos con S/B mayor que 20 cuando la disociación con ácidos se aplicó al ensayo de formación de puentes.

La figura 7 es una representación de las muestras de suero de la línea de base de enfermedad cuando se analizan en el ensayo de formación de puentes de MSD con y sin disociación con ácidos, así como con el método PEG y ácido (PandA). Los resultados fueron comparables entre el ensayo de formación de puentes de MSD sin tratamiento con

ácidos y el método PandA, mientras que el tratamiento con ácidos produjo mayores niveles de S/B para la mayoría de las muestras ensayadas, lo cual sugiere una interferencia de la diana del fármaco debido al efecto de dimerización a pH bajo.

5 Tal como se muestra en FIGs 6 y 7, para el fármaco B, el ensayo de formación de puentes con disociación con ácidos no es una estrategia plausible en una población normal o enferma, debido a la dimerización de la diana de fármaco a un pH menor, que provoca resultados falsos positivos para todas las muestras, con resultados proporcionales a la cantidad de diana endógena. Por esta razón, la sensibilidad del ensayo y la tolerancia al fármaco para el fármaco B solo pudo compararse entre el método PandA y el ensayo de formación de puentes de MSD existente sin disociación con ácidos.

10 Las FIGs 8A-B y 9A-B son resúmenes de los datos para el fármaco B, que comparan el formato de ensayo de formación de puentes sin disociación con ácidos con el método de PEG y ácido (PandA).

15 En la figura 8A, el formato de ensayo de formación de puentes de MSD produjo una respuesta a la dosis aceptable para la detección de ADA en ausencia del fármaco, y se observa una inhibición completa con 10 µg/ml y una disminución de la sensibilidad desde 47 ng/ml en ausencia del fármaco hasta 2 µg/ml del anticuerpo con 10 µg/ml del fármaco.

Para el fármaco B, la sensibilidad del ensayo de formación de puentes sin disociación con ácidos se validó a 50 ng/ml con una baja tolerancia al fármaco. Los niveles de fármaco de 250 ng/ml inhibieron la detección de anticuerpos antifármaco B a 250 ng/ml, y los niveles de fármaco de 1 µg/ml inhibieron la detección del anticuerpo a 500 ng/ml.

20 Las FIGs. 9A-B son un resumen de los datos del formato de precipitación de PandA. Los resultados indican una respuesta a la dosis aceptable en ausencia del fármaco, y se no observa inhibición debida al fármaco presente en las muestras. Los porcentajes de recuperación permanecen aceptables mayoritariamente entre 80-120%, independientemente de la cantidad de fármaco presente en las muestras, cuando se compara con los resultados de las muestras sin fármaco como referencia. La sensibilidad de la detección del ensayo se mantuvo en 39 a 63 ng/ml, a pesar del fármaco presente a 250 µg/ml, que es mayor que la Cmax esperada.

25 5.1 Fármaco C

Evaluación de la sensibilidad y la tolerancia al fármaco

Para el fármaco C, se comparó la sensibilidad del ensayo y la tolerancia al fármaco entre el nuevo método y el ensayo de formación de puentes de MSD existente con disociación con ácidos, en el que no puede lograrse la tolerancia al fármaco esperada.

30 Las FIGs. 10A-B y 11A-B son resúmenes de los datos para el fármaco C, que comparan el formato de ensayo de formación de puentes con disociación con ácidos con el método de PEG y ácido (PandA).

35 En las FIGs. 10A-B, el formato de ensayo de formación de puentes de MSD dio como resultado una sensibilidad aceptable en ausencia del fármaco, pero se observó una inhibición con tan poco como 2,5 µg/ml del fármaco, a pesar del tratamiento con ácidos en el inmunoensayo de formación de puentes. La sensibilidad del ensayo cambió de 227 ng/ml a 2788 ng/ml en presencia de 25 µg/ml, y los anticuerpos fueron completamente indetectables en presencia de 250 µg/ml del fármaco, niveles esperados en algunas muestras clínicas.

40 Las FIGs 11A-B muestran que los resultados de PandA son mejores que el inmunoensayo de formación de puentes con disociación con ácidos, en el que la detección del anticuerpo se mantiene con una recuperación completa incluso en presencia de 250 µg/ml del fármaco. Los porcentajes de recuperación se observaron mayoritariamente entre 80-120%, independientemente de la cantidad de fármaco presente en las muestras, cuando se compara con los resultados de las muestras sin fármaco como referencia. La sensibilidad de la detección del ensayo se mantuvo entre 129-175 ng/ml, a pesar del fármaco presente a 250 µg/ml, que es mayor que lo que se espera en muestras clínicas.

Los ejemplos anteriores describen estudios de casos para tres anticuerpos monoclonales humanizados A-C (un fármaco de IgG1 y 2 fármacos de IgG4).

45 Los tres ensayos de ADA PandA específicos de fármaco dieron como resultado la recuperación completa de ADA en muestras que contenían unos niveles de fármaco en exceso a los esperados en pacientes, en contraste con la estrategia de ensayo de disociación en los ensayos de formación de puentes de MSD que se emplean habitualmente. Este método nuevo y avanzado ofrece una mejora significativa frente a las estrategias actuales. De hecho, la interferencia de fármaco o la infradetección de ADA en los tres casos fueron completamente eliminadas, y este principio de ensayo no solo puede utilizarse para ensayos de ADA sino también en el análisis de PK y de biomarcadores (diana de fármacos) en presencia de factores de interferencia.

50

Se mostró que el método de ensayo de ADA PandA descrito en la presente es eficaz para mejorar la detección y la recuperación de ADA en muestras que contienen niveles interferentes en exceso de lo que resulta clínicamente pertinente. El método también produce unas titulaciones de anticuerpos consistentes, independientemente de la

cantidad de fármaco presente. Se mostró que el método es mejor que el ensayo de formación de puentes basado en la solución tradicional con disociación con ácidos, manteniendo la sensibilidad de la detección de ADA a unos niveles de fármaco en exceso de los niveles de Cmax clínicos esperados y sin inhibición significativa.

5 El método PandA también puede aplicarse a ensayos de PK, en los que un ADA o una diana de fármaco es un interferente. Simplemente, se añadiría un exceso de anticuerpo (anti-idiotipo) o diana para formar los complejos, y la detección se realizaría empleando un anticuerpo anti-idiotipo marcado que sea específico para el fármaco. Además, el método puede aplicarse a ensayos de biomarcadores de dianas de fármacos con interferencia de fármacos potencial. En resumen, los inventores han descrito una nueva aplicación para la precipitación con PEG de complejos que resuelve las interferencias del fármaco y probablemente de la diana en un inmunoensayo de ADA.

10 Se han usado muchos métodos y plataformas diferentes con un éxito limitado para solucionar la interferencia de fármacos en circulación en inmunoensayos para la detección de ADA. Esta descripción describe un nuevo método que emplea PEG y ácido (PandA) que elimina las interferencias del fármaco y probablemente de la diana en un inmunoensayo de ADA. El nuevo método mostró la eliminación completa de la interferencia del fármaco a altas concentraciones de fármaco y al mismo tiempo mantiene la sensibilidad del ensayo, en contraste con el ensayo de formación de puentes de MSD basado en la solución tradicional sin, o incluso con, disociación con ácidos. Aplicando los siguientes componentes del ensayo, el ensayo PandA ha demostrado su uso previsto para detectar, de modo sensible y específico, el ADA en presencia de un fármaco y/o una diana de fármaco: la adición de un material de fármaco en exceso para formar complejos de fármaco/ADA; una precipitación empleando polietilenglicol para obtener ADA total; una disociación con ácidos y el revestimiento del precipitado reconstituido en una disolución de ácido sobre una placa de carbono de alto potencial de unión con una gran capacidad para permitir la unión al ADA disociado; y la detección específica de los niveles de ADA totales y el fármaco conjugado con Sulfo-TAG® con un resultado de salida en forma de ECL.

25 Además, este método también produce títulos de anticuerpos consistentes, independientemente de la cantidad de fármaco presente en la muestra, lo cual demuestra la precisión del ensayo. También se demuestra que el método resuelve, de modo eficaz, la interferencia de la diana que provoca resultados falsos positivos debido a la dimerización de la diana en inmunoensayos de formación de puentes de MSD con disociación con ácidos.

30 En resumen, el método es mejor que el método tradicional de formación de puentes con disociación con ácidos, tal como demuestran los tres estudios demostrativos preliminares indicados anteriormente, en el que se logró la recuperación completa y la detección de ADA en muestras con altas cantidades de fármaco en las muestras. Este método se validó con éxito según las expectativas reguladoras actuales y las muestras clínicas ensayadas.

35 El método PandA descrito en la presente ha demostrado una mejora significativa para la detección de ADA en presencia de un exceso de fármaco. Presenta amplias aplicaciones basadas en los principios: (1) saturación del analito libre para que todo el analito se una en un complejo, (2) precipitación de los complejos, (3) disociación con ácidos hasta obtener el analito libre sin neutralización, para reducir la unión nuevamente del analito, a la vez que reviste el analito libre en una condición ácida sobre una gran superficie de revestimiento para inmovilizar el analito libre, y (4) detección del analito libre empleando un reactivo específico. En los ejemplos anteriores, los inventores han proporcionado tres estudios de casos de inmunogenicidad para demostrar la utilidad de esta nueva tecnología.

Otras realizaciones

40 Se entiende que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada, la anterior descripción solo pretende ilustrar, y no limitar, el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones anejas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo antifármaco (ADA) en una muestra, comprendiendo el método:
 - 5 poner en contacto la muestra con una cantidad en exceso de un fármaco al que el ADA se une para formar complejos de fármaco/ADA;
 - poner en contacto los complejos de fármaco/ADA con polietilenglicol (PEG) para formar un precipitado que comprende complejos de fármaco/ADA;
 - poner en contacto el precipitado con una disolución para disociar los complejos de fármaco/ADA, formando de ese modo ADAs disociados y fármacos disociados;
 - 10 inmovilizar sobre un sustrato los ADAs disociados, en condiciones para mantener separados los ADA disociados y fármacos disociados; y
 - determinar si el ADA está presente o ausente en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación comprende:
 - poner en contacto el ADA inmovilizado con un fármaco marcado con un marcador detectable; y
 - 15 determinar la presencia o ausencia de dicho marcador detectable para determinar de ese modo la presencia o la ausencia de ADA en la muestra.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el sustrato es una placa de carbono de alto potencial de unión, o comprende una superficie de carbono porosa.
4. El método de la reivindicación 1, la muestra se diluye antes de ponerla en contacto con una cantidad en exceso del fármaco, y en el que la muestra se diluye 1:2, 1:5, 1:10 o 1:20.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el sustrato comprende una superficie de carbono, una superficie de vidrio, una superficie de sílice, una superficie metálica, un material polimérico, una superficie que contiene un revestimiento metálico o químico, una membrana, una perla, una matriz polimérica porosa, o sustratos que comprenden fibras celulósicas, o cualquiera de sus combinaciones.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que el sustrato comprende un material polimérico, en el que el material polimérico comprende poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, poliamida, policarbonato, o cualquiera de sus combinaciones.
7. El método de la reivindicación 2, en el que el marcador detectable comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquimioluminiscente, y un sustrato para una reacción de detección enzimática, o el marcador detectable es un marcador Sulfo-TAG®.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fármaco comprende uno cualquiera de:
 - un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético, un carbohidrato, un lípido, o un compuesto de molécula pequeña orgánico o inorgánico, o cualquiera de sus combinaciones;
 - 35 un anticuerpo, y en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico; o
 - una enzima, una proteína de unión modificada, una proteína similar a un anticuerpo modificada, una proteína de fusión, o una proteína estructural, o cualquiera de sus combinaciones.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el fármaco es un fármaco modificado para que muestre menos inmunogenicidad, en comparación con el mismo fármaco en forma no modificada.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el PEG:
 - comprende al menos un PEG seleccionado del grupo que consiste en PEG1000, PEG1450, PEG3000, PEG6000, PEG8000, PEG10000, PEG14000, PEG15000, PEG20000, PEG250000, PEG30000, PEG35000, y PEG40000; o
 - tiene un peso molecular entre 1.000 y 20.000 daltons.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra se pone en contacto con PEG a una concentración de entre 0,1% y 10,0%, de entre 3,0% y 6,0%, de 3,0%, o de entre 1,2% y 1,5%.

12. El método de la reivindicación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además, después de la etapa de inmovilización, tratar el soporte para eliminar el fármaco no unido.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además, después de poner en contacto la muestra con PEG, lavar el precipitado.
- 5 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la disolución ácida para disociar los complejos de fármaco/ADA comprende un ácido.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el ácido:
- es un ácido orgánico, un ácido inorgánico, o una de sus mezclas;
 - está a una concentración de entre 0,1 M y 5 M; o
- 10 - se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glutámico, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico, ácido trifluoroacético, ácido bencenosulfónico, ácido aminometanosulfónico, ácido canfo-10-sulfónico, ácido cloroacético, ácido bromoacético, ácido yodoacético, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido glicérico, ácido succínico, ácido málico, ácido aspártico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, y cualquiera de sus combinaciones.
- 15
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la muestra biológica comprende el fármaco.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el método comprende además inmovilizar el fármaco sobre el sustrato antes o después de la etapa de inmovilizar el ADA sobre el sustrato.
- 20 18. El método de la reivindicación 7, en el que la muestra biológica comprende un material seleccionado del grupo que consiste en fluidos corporales, secreciones mucosas, saliva, sangre, sangre completa, plasma, suero, humor vítreo, y fluido de humor acuoso.

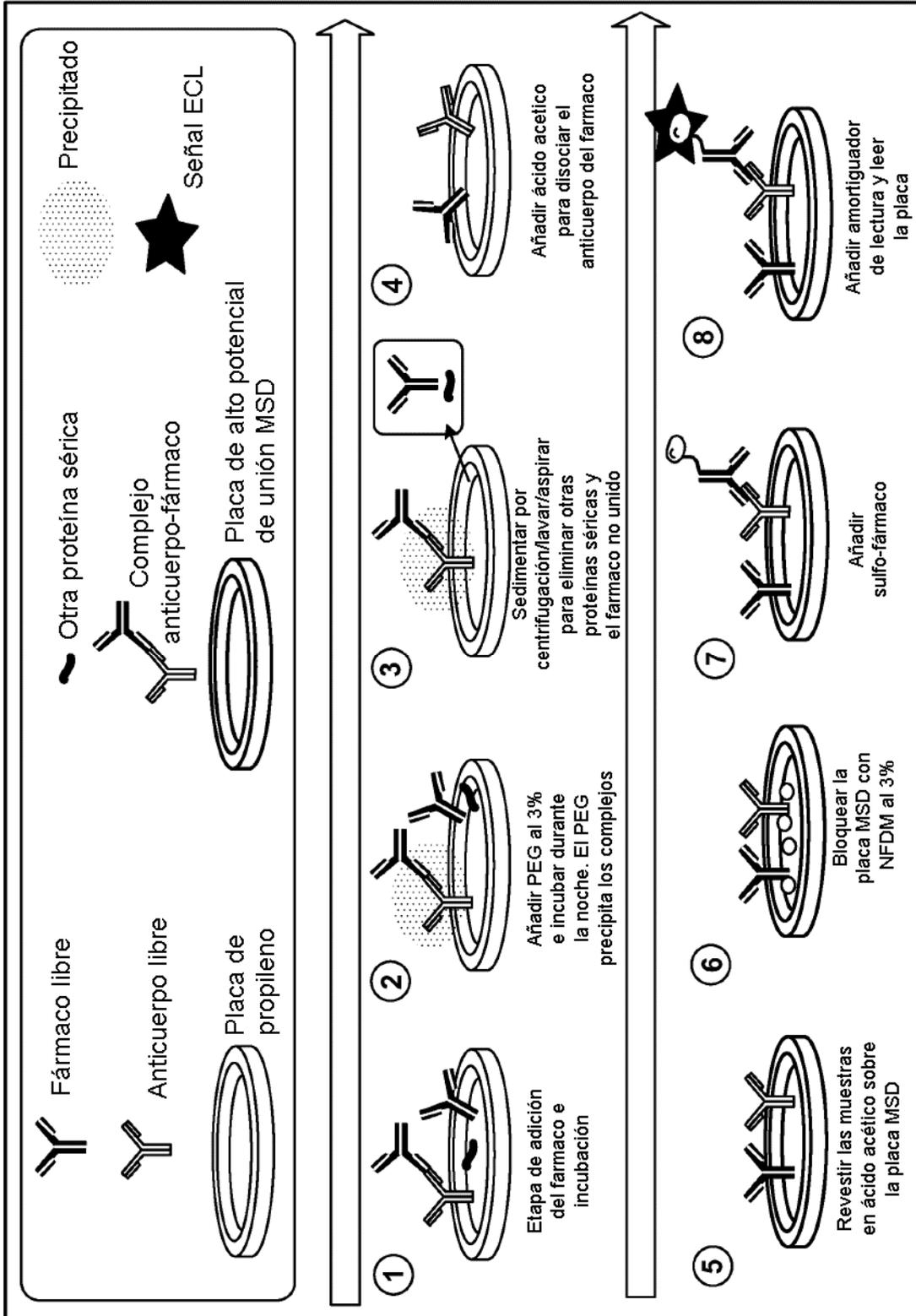


FIG. 1

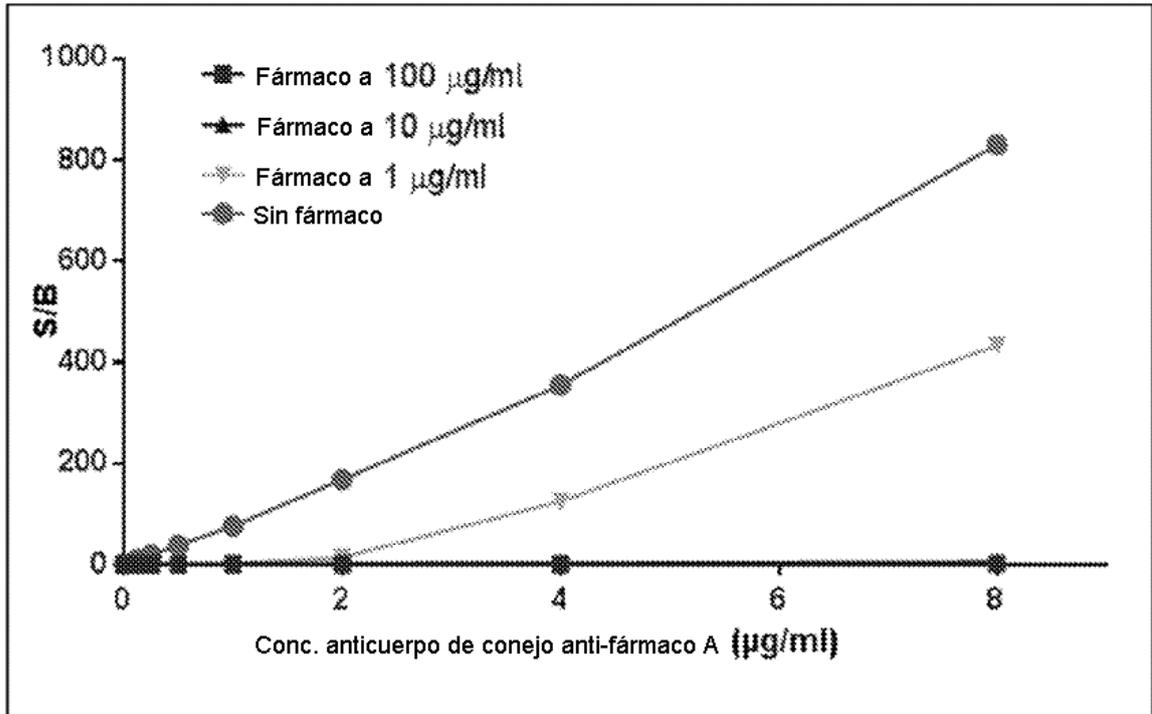


FIG. 2A

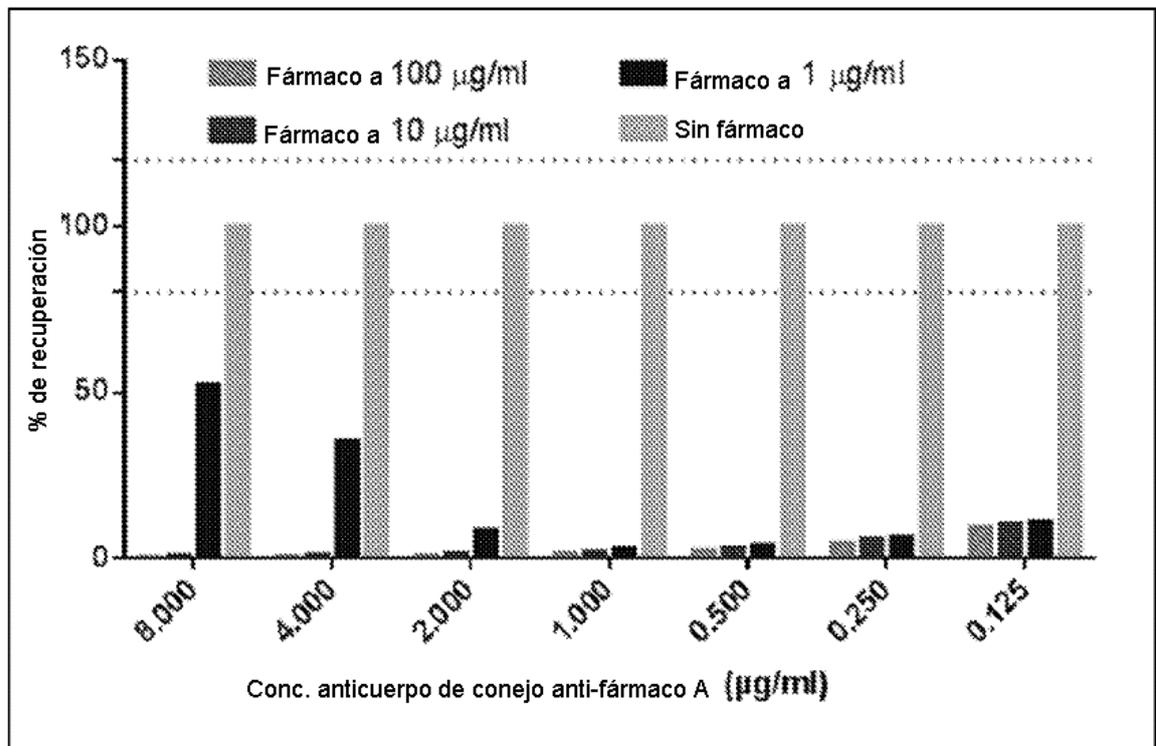


FIG. 2B

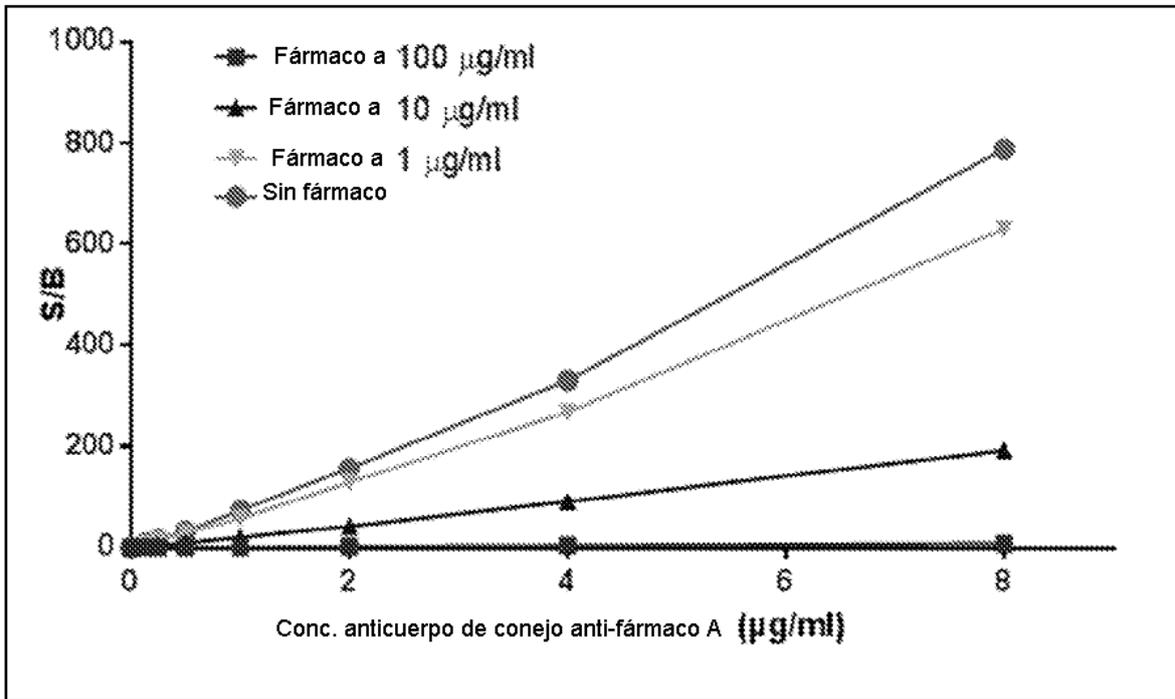


FIG. 3A

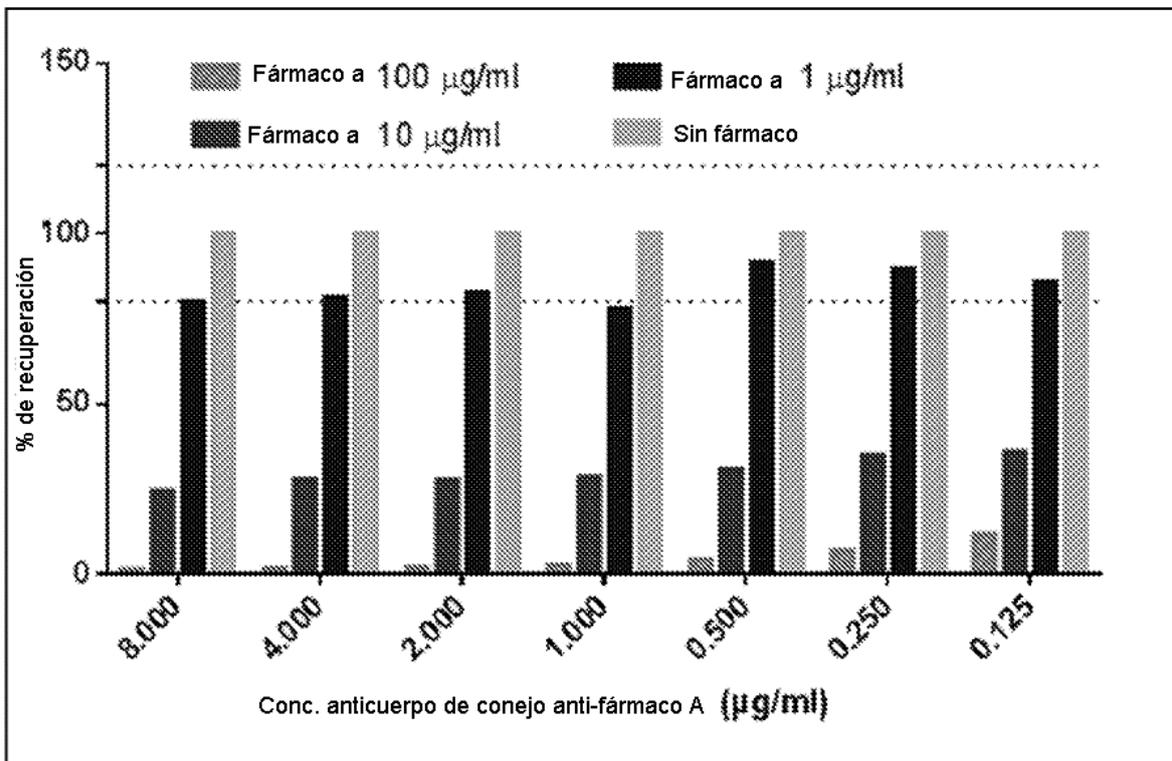


FIG. 3B

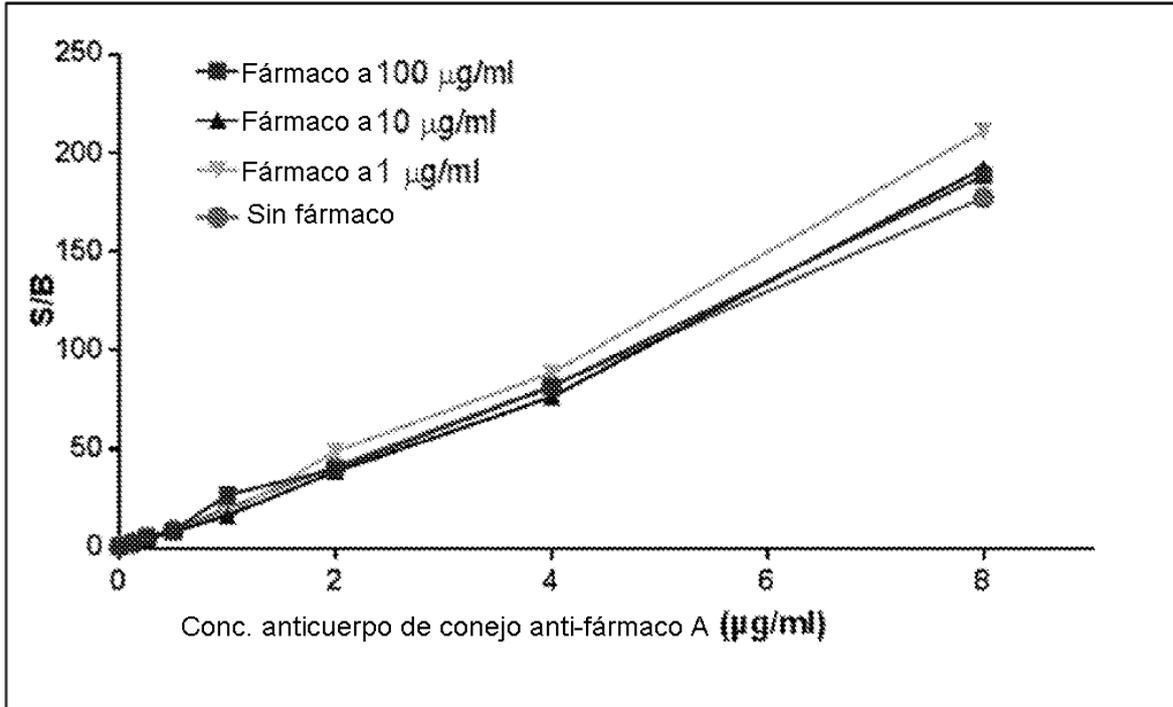


FIG. 4A

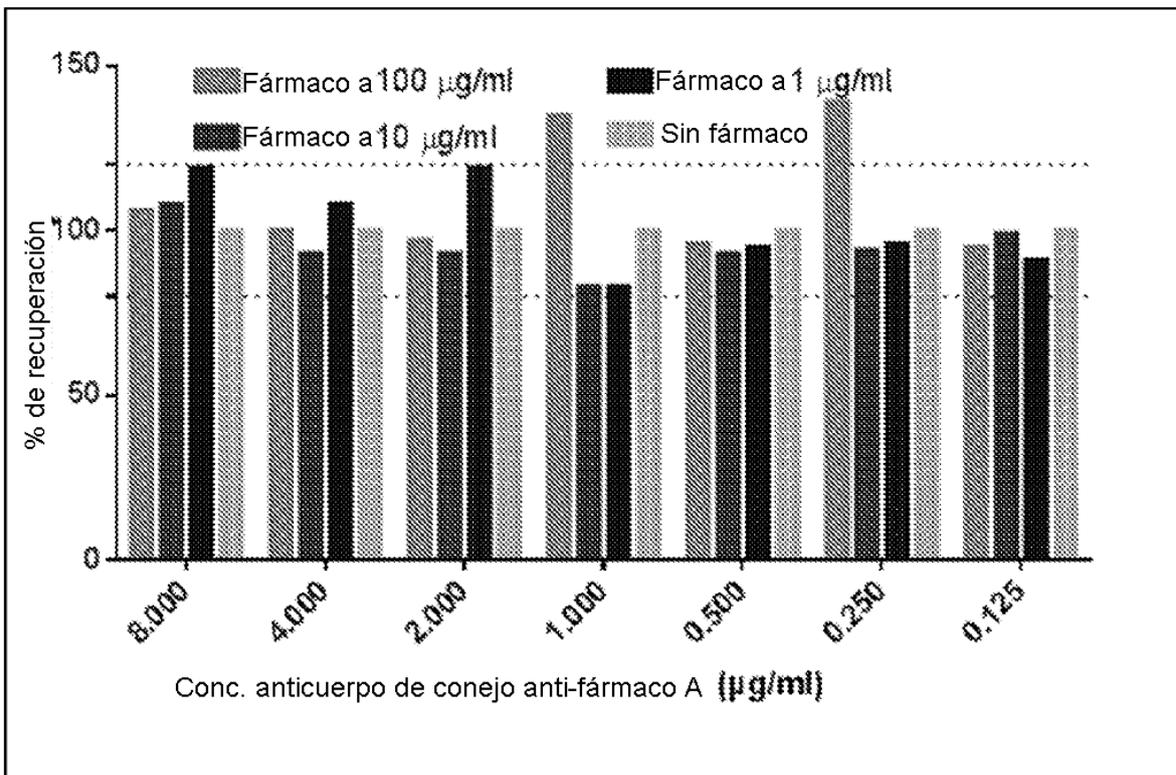


FIG. 4B

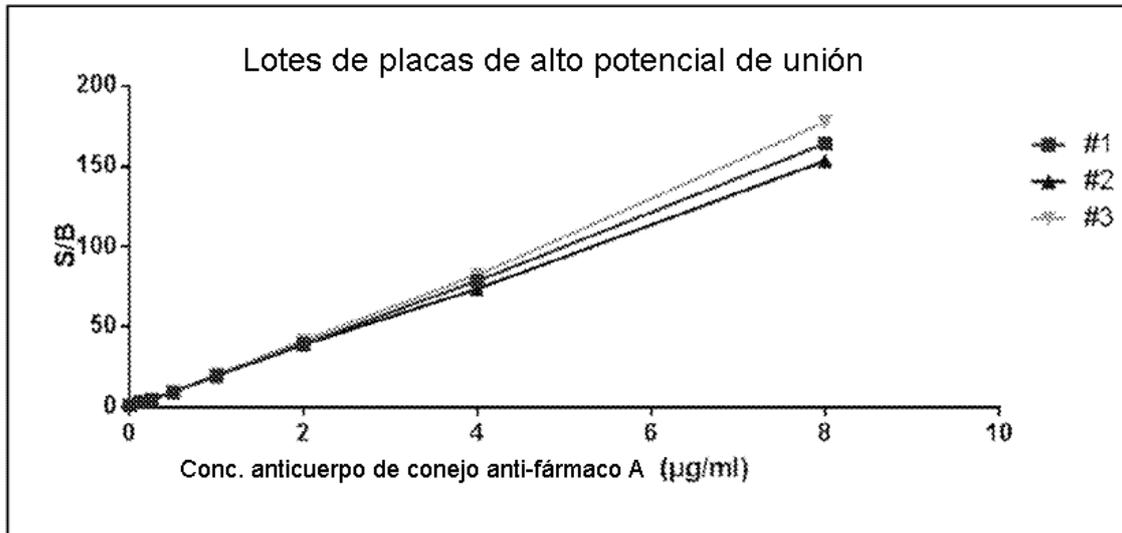


FIG. 5

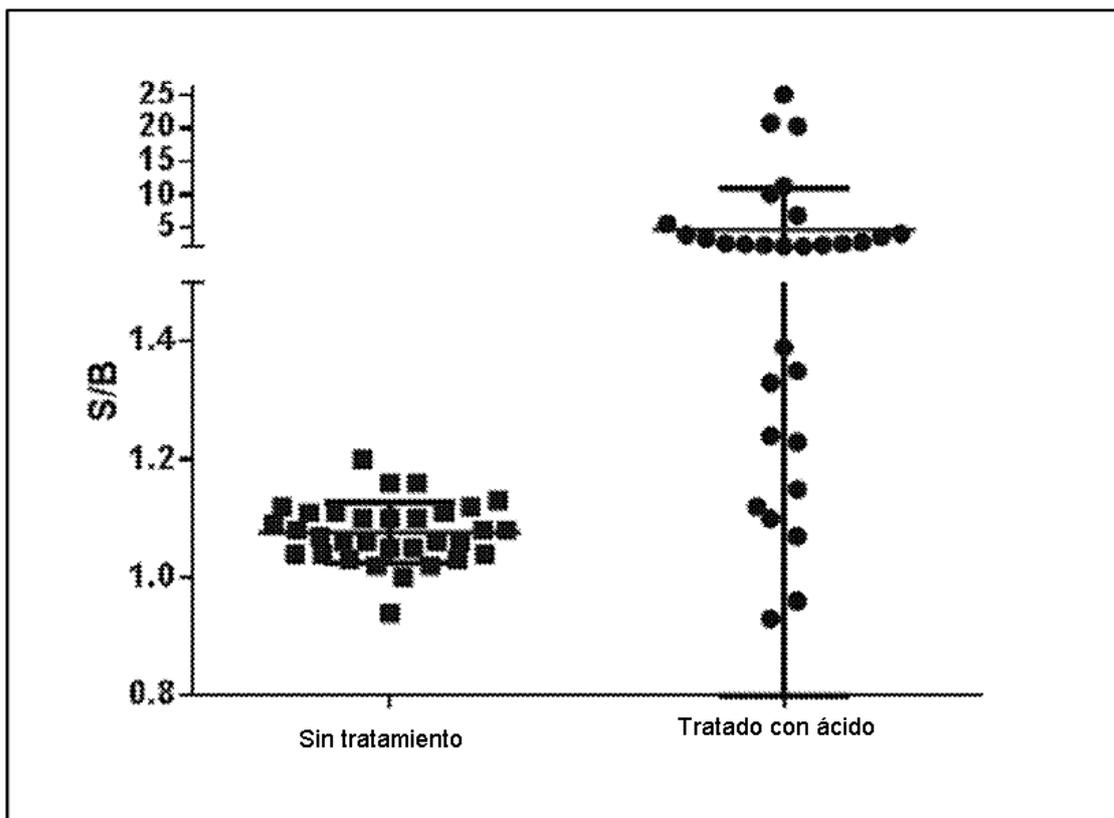


FIG. 6

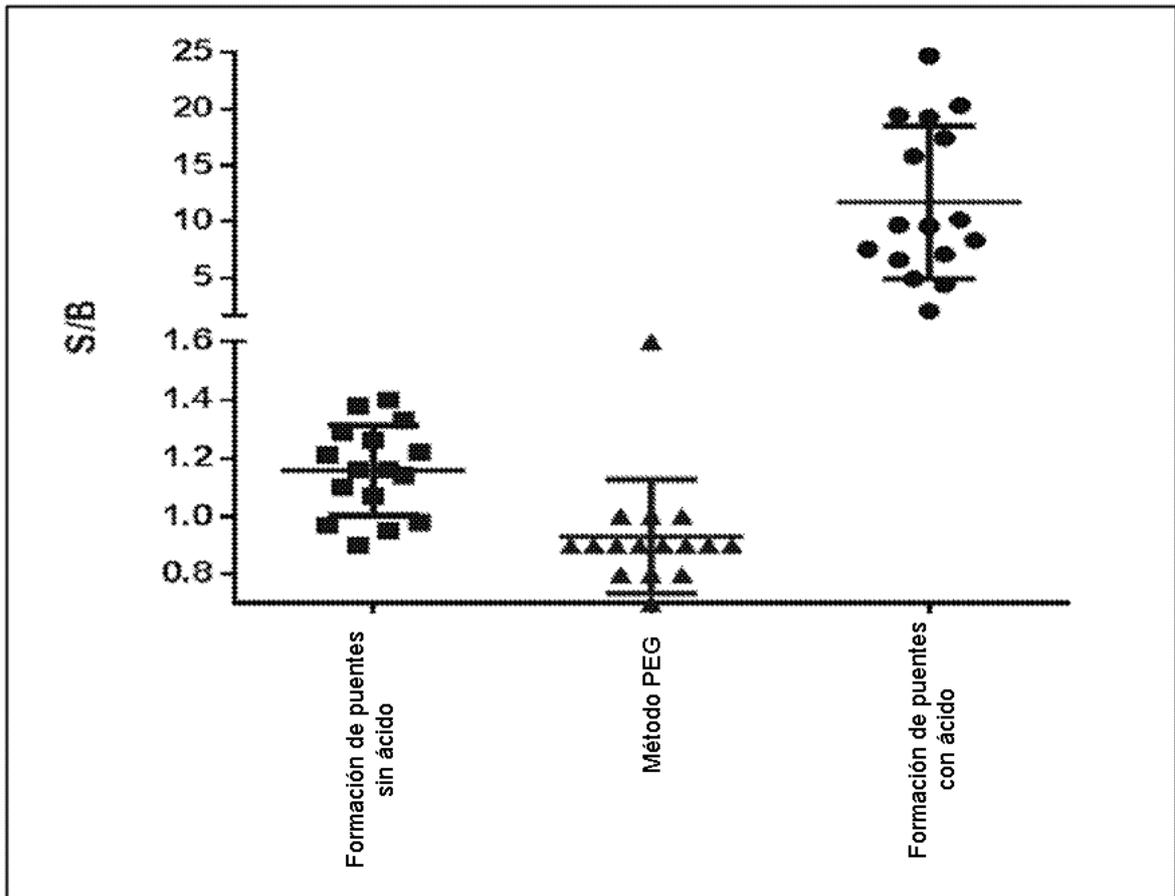


FIG. 7

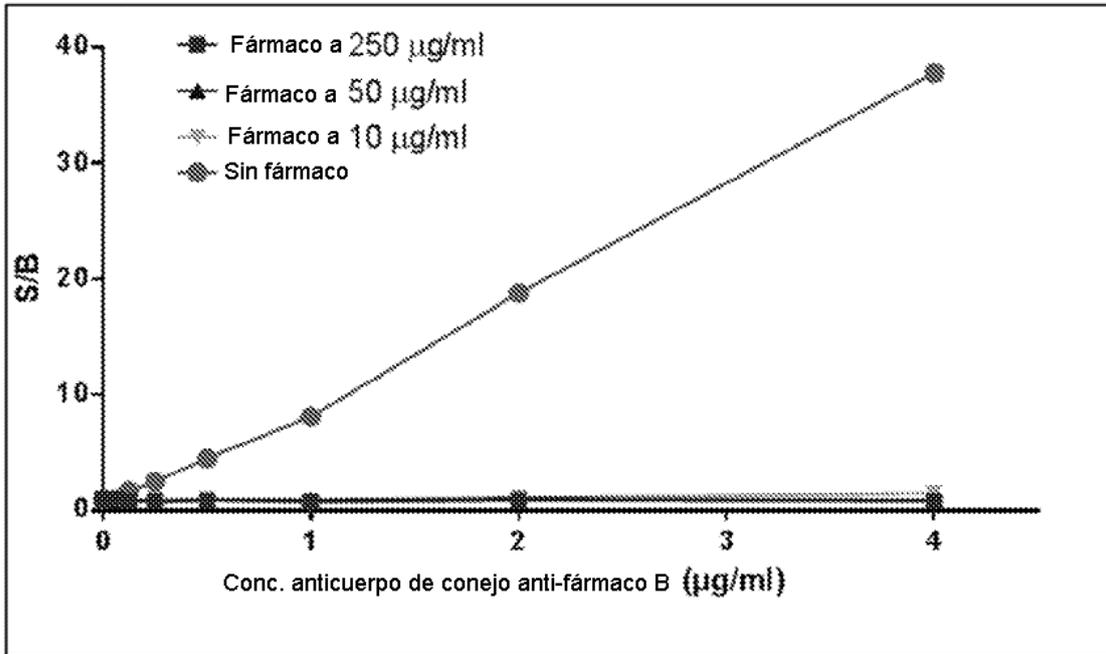


FIG. 8A

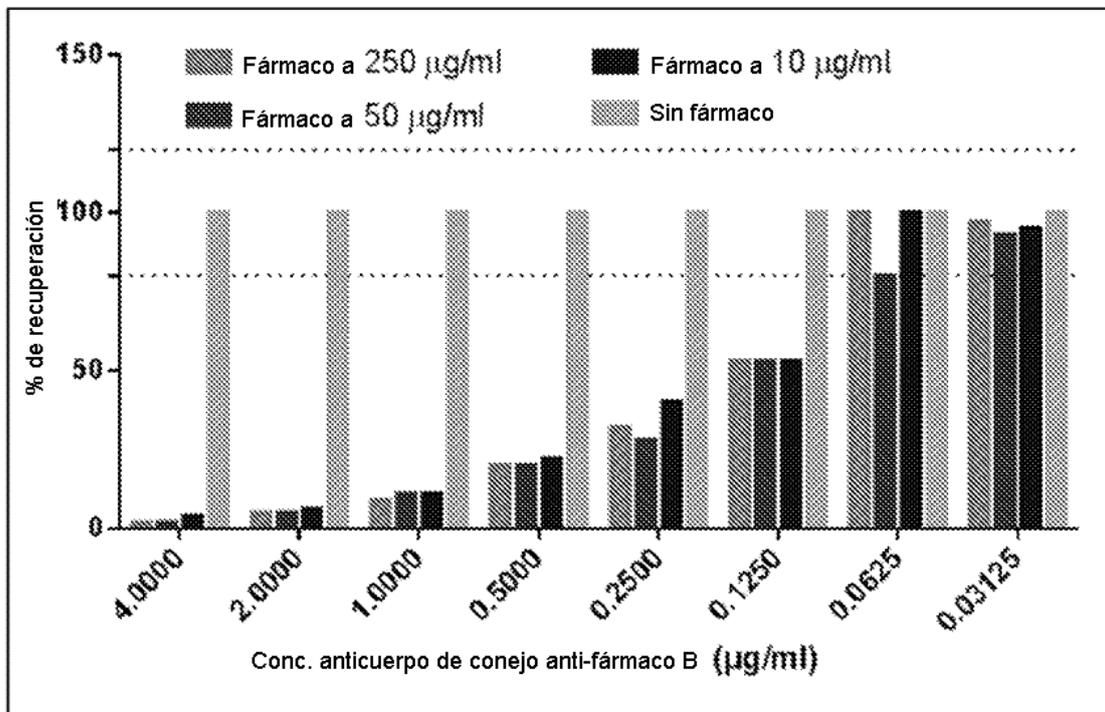


FIG. 8B

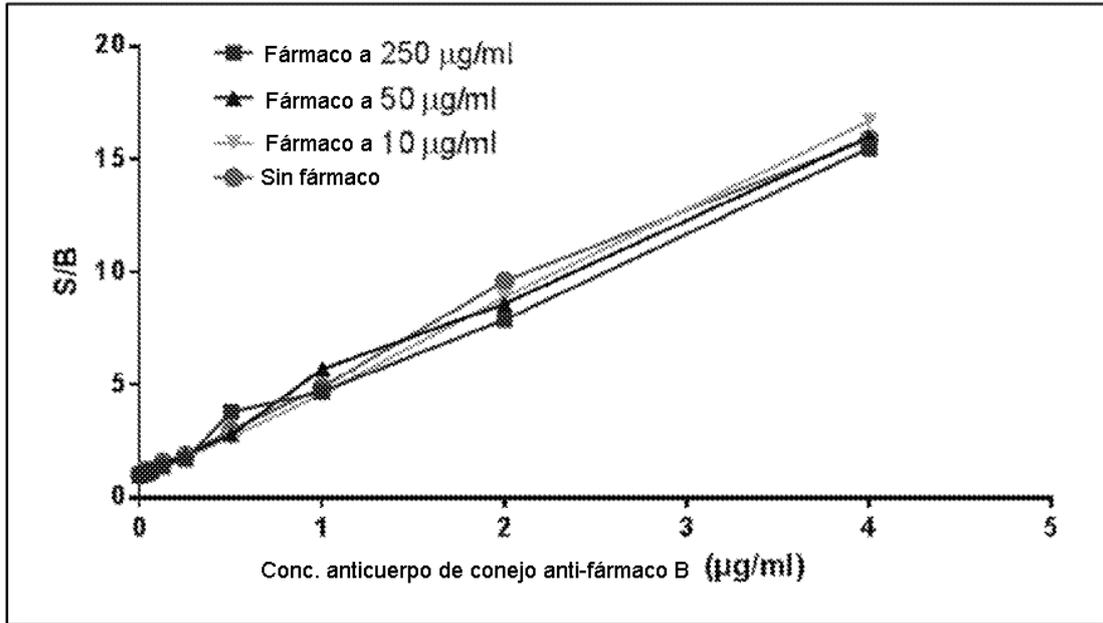


FIG. 9A

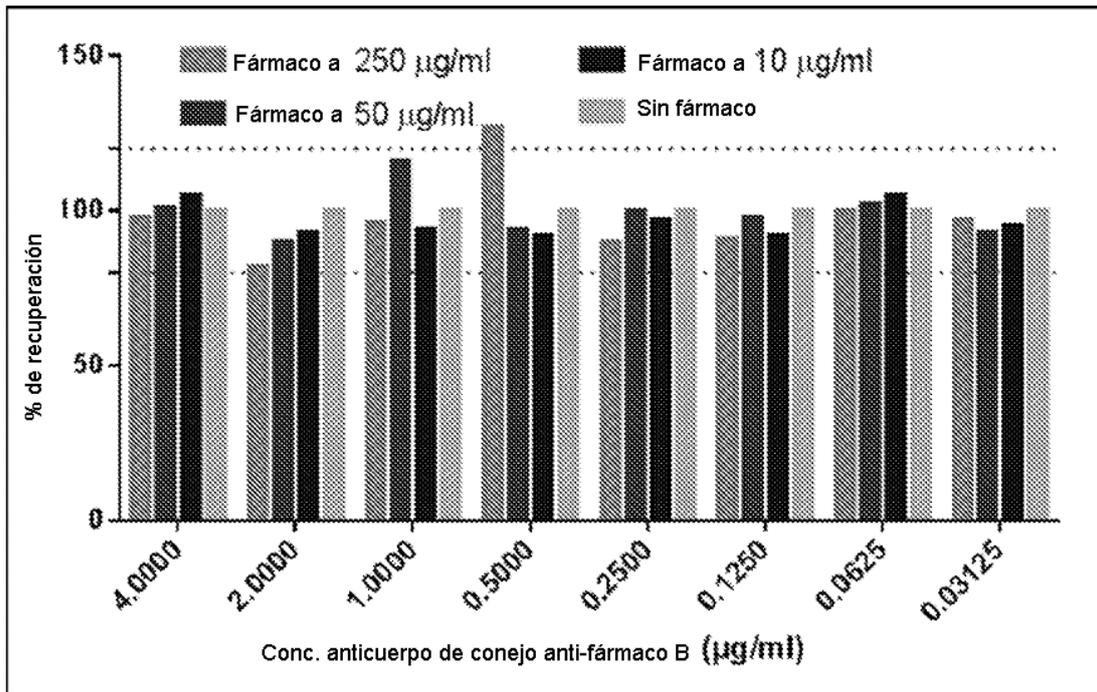


FIG. 9B

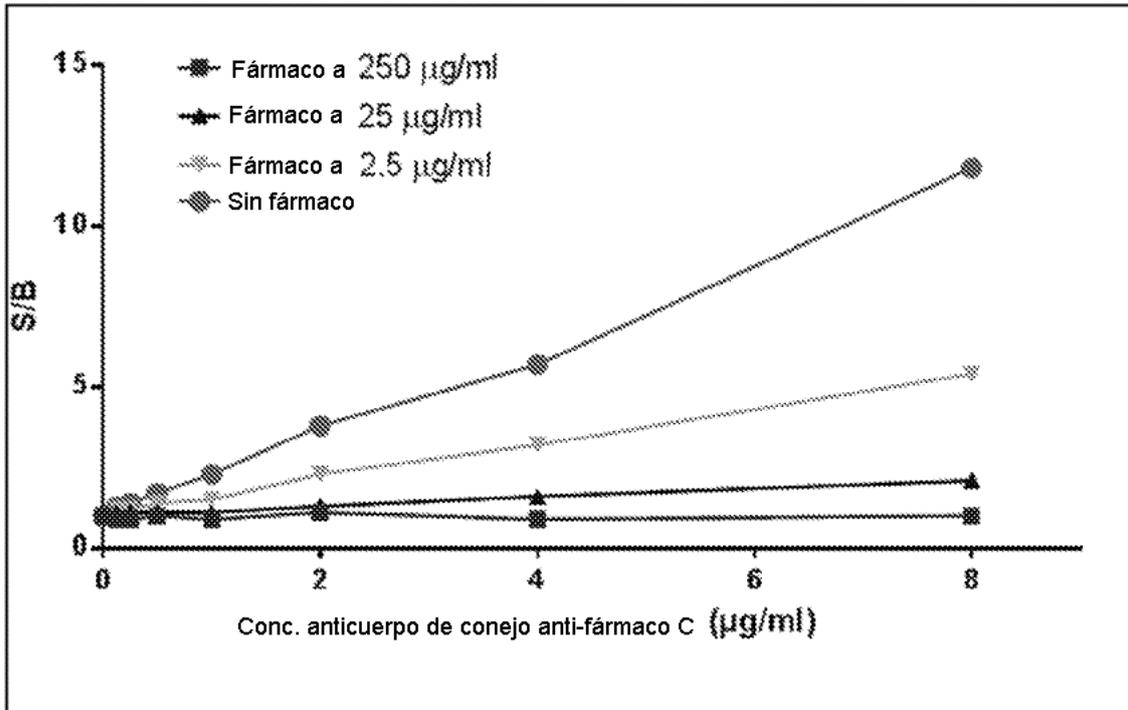


FIG. 10A

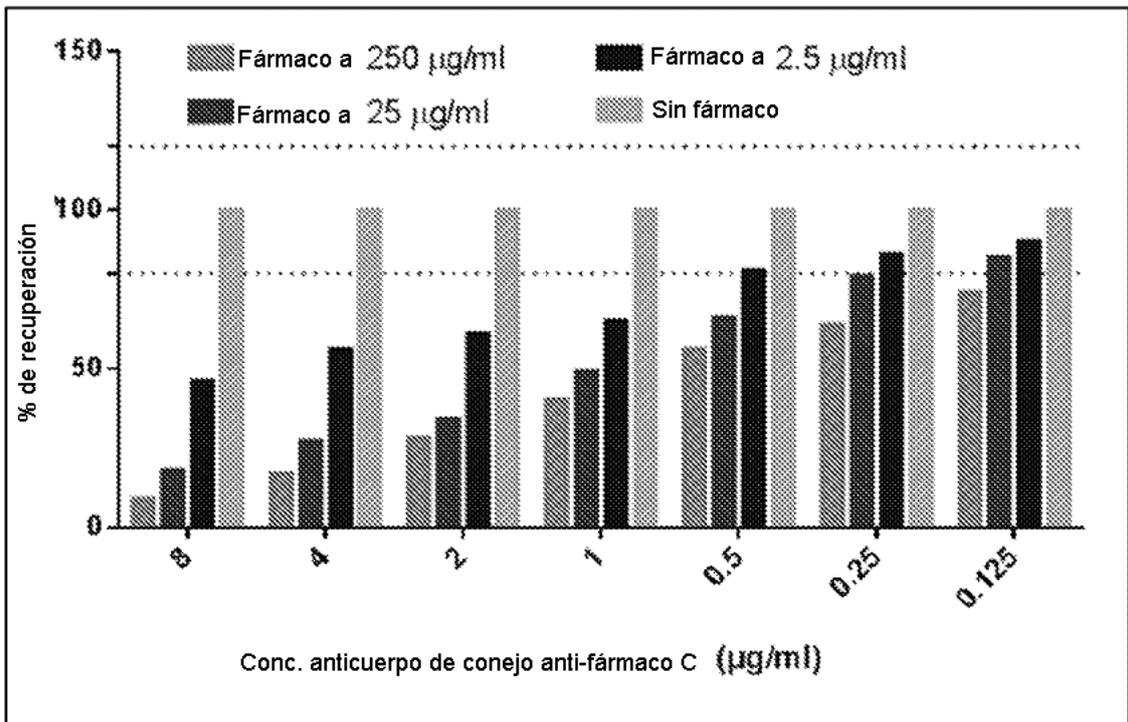


FIG. 10B

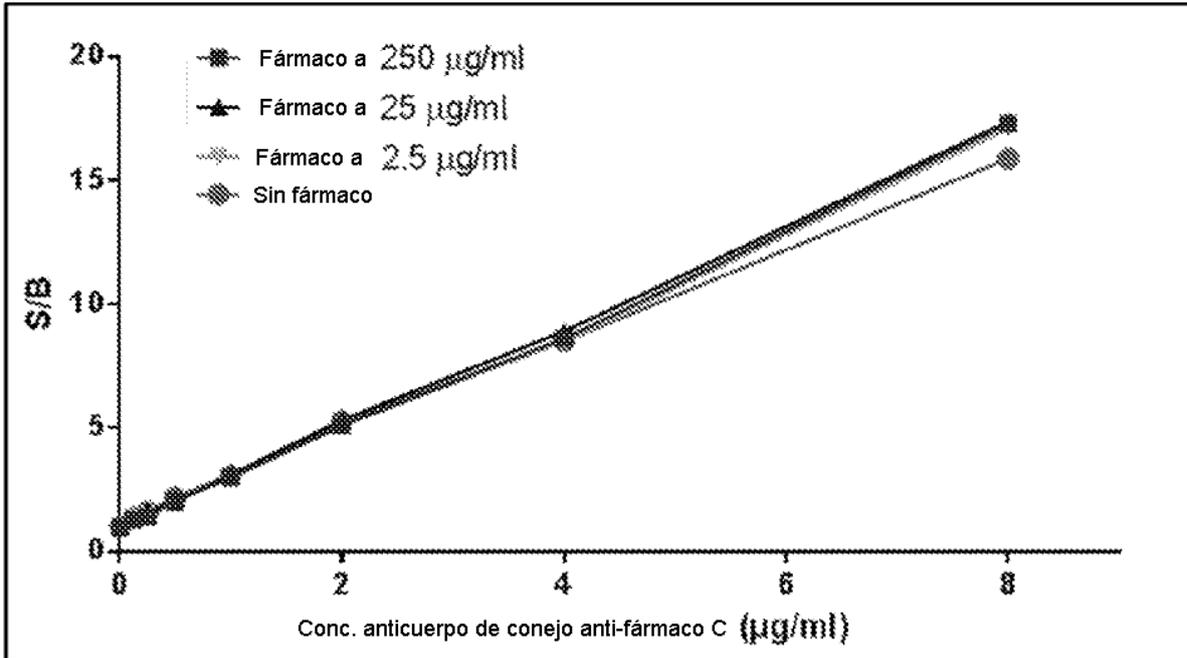


FIG. 11A

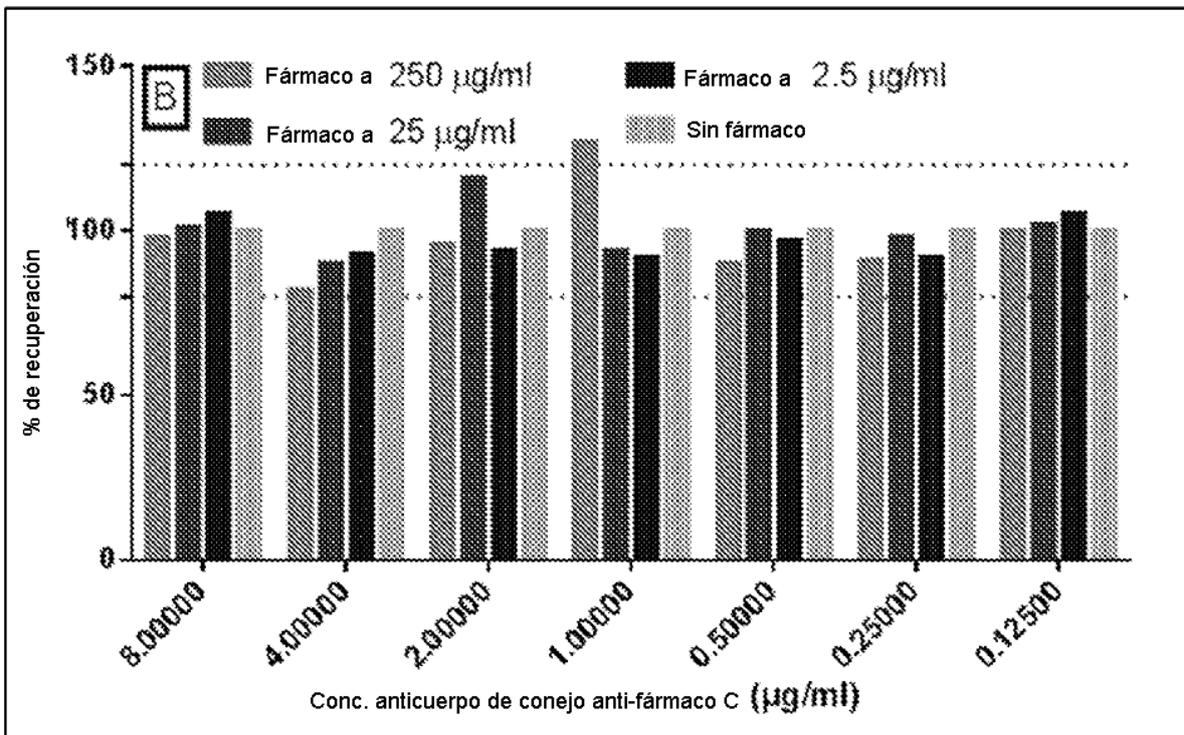


FIG. 11B