



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0612591-3 A2**

(22) Data de Depósito: 05/07/2006  
(43) Data da Publicação: 23/11/2010  
(RPI 2081)



(51) *Int.Cl.:*  
G01N 33/53

(54) Título: **DETECÇÃO DE UM ANTÍGENO-ALVO INDEPENDENTEMENTE DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE UM ANTICORPO TERAPÊUTICO CORRESPONDENTE**

(30) Prioridade Unionista: 06/07/2005 EP 05 014618.2, 06/03/2006 EP 06 004447.6, 06/03/2006 EP 06 004447.6, 06/07/2005 EP 05 014618.2

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

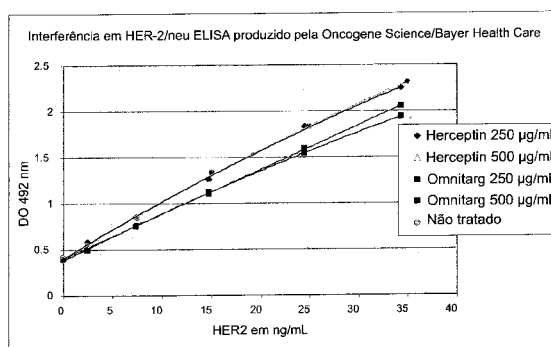
(72) Inventor(es): HELMUT LENZ, MARTINA THIER, WERNER SCHEUER

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006006524 de 05/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/003420 de 11/01/2007

(57) Resumo: DETECÇÃO DE UM ANTÍGENO-ALVO INDEPENDENTEMENTE DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE UM ANTICORPO TERAPÊUTICO CORRESPONDENTE. A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos terapêuticos. A invenção refere-se especialmente a um processo de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas de a) fornecimento da amostra que será analisada, b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico com o dito antígeno-alvo, através da qual é formado um complexo antígeno-alvo - anticorpo terapêutico e c) detecção do complexo formado em (b).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DETECÇÃO DE UM ANTÍGENO-ALVO INDEPENDENTEMENTE DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE UM ANTICORPO TERAPÊUTICO CORRESPONDENTE"**.

5 A presente invenção refere-se a um método para a detecção de um antígeno-alvo independentemente da presença ou da ausência de um anticorpo terapêutico correspondente. Refere-se especialmente à medida de um antígeno-alvo na presença de um anticorpo terapêutico correspondente. A presente invenção descreve um método de detecção do antígeno-alvo de  
10 um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas de a) de fornecimento da amostra que será analisada, b) de incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico ao dito antígeno-alvo, em que é formado um complexo de antígeno-alvo - anticorpo terapêutico e c) de detecção  
15 do complexo formado em (b). Refere-se ainda ao uso do dito método no acompanhamento de um paciente.

Antecedentes da Invenção

Desde o desenvolvimento dos primeiros anticorpos monoclonais por Köhler e Milstein em 1974 muitos esforços foram dedicados ao  
20 desenvolvimento de anticorpos que são apropriados para terapia em seres humanos. Os primeiros anticorpos monoclonais que se tornaram disponíveis foram desenvolvidos em camundongos e ratos. Estes anticorpos quando utilizados para terapia de seres humanos causavam efeitos colaterais indesejados por causa de anticorpos anti-roedor. Muitos esforços fo-  
25 ram dedicados à redução ou até mesmo à eliminação de tais efeitos colaterais indesejados.

Nos últimos dez anos um número continuamente crescente de anticorpos monoclonais humanos ou anticorpos monoclonais humanizados atingiu o mercado. Os exemplos bem-conhecidos incluem, por exemplo,  
30 Herceptin® e MabThera® da Hoffmann-La Roche, Basel.

Um número bastante significativo de anticorpos monoclonais humanos ou humanizados está sob investigação e precisa ser estudado em

animais experimentais, antes que a entrada em humanos possa ser considerada para as primeiras finalidades de teste.

Os anticorpos monoclonais terapêuticos tipicamente têm que ser utilizados com níveis no soro variando de aproximadamente entre 1 nanogramas por mL até aproximadamente 100 microgramas por mL. O anticorpo terapêutico, assim pelo menos em certos pontos de tempo durante um regime de tratamento, está presente em uma concentração bastante alta, por exemplo, em uma concentração que é tão alta ou até mesmo mais alta que a concentração do antígeno-alvo correspondente.

Uma medida correta do próprio antígeno-alvo é considerada muito importante especialmente no acompanhamento de pacientes após terapia e especialmente após terapia com um anticorpo terapêutico correspondente. Uma vez que durante o curso de um regime de tratamento a concentração de um anticorpo terapêutico variará até uma grande extensão, qualquer interferência de tal anticorpo terapêutico em um ajuste de ensaio para a medida de seu antígeno-alvo correspondente pode e mais provavelmente levará a medidas falsas para o dito antígeno-alvo.

O nível de um antígeno-alvo pode ser detectado através de qualquer método apropriado. Na rotina clínica tais métodos na maior parte dos casos empregarão anticorpos para o antígeno-alvo, os assim chamados ensaios imunológicos. Uma concentração alta e/ou variável de um anticorpo terapêutico pode interferir no ensaio imunológico utilizado para medir o nível de seu antígeno-alvo.

Como o versado na técnica já considerará, não é possível ou pelo menos não é uma tarefa fácil, utilizar o próprio anticorpo terapêutico na detecção de seu antígeno-alvo correspondente. A mesma dificuldade será freqüentemente encontrada se o anticorpo terapêutico e pelo menos um dos anticorpos utilizados em um ensaio imunológico se ligarem ao mesmo epítipo de um antígeno-alvo. Enquanto este fato é bem-conhecido e geralmente aceito, foi descoberto agora de forma surpreendente que um ensaio imunológico para a detecção de um antígeno-alvo também pode ser comprometido pela presença ou pela ausência de um anticorpo terapêutico mesmo se o

anticorpo terapêutico se ligar a um epitopo não ligado pelo anticorpo ou pelos anticorpos utilizados em um ensaio imunológico para o antígeno-alvo correspondente.

Jilani e outros (Jilani, I. e outros, Blood 1032 (2003) 3514-3520) relataram que para detectar rituximab na superfície celular, foram utilizados anticorpos que detectavam especificamente a sequência de camundongo no rituximab e não faziam reação cruzada com a Ig humana. No WO 03/024993 é relatado um método de detecção e de monitoramento de um complexo de anticorpo terapêutico:antígeno, antígeno solúvel, anticorpo terapêutico livre e anticorpo terapêutico total solúvel.

Era uma tarefa da presente invenção investigar se os métodos de detecção de um antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra podem ser melhorados. Tal método deve fornecer um valor real e correto para a concentração do antígeno-alvo, não importando se o anticorpo terapêutico correspondente está presente ou não e se deve ser utilizado em medidas consecutivas, por exemplo, no acompanhamento de pacientes.

Esta tarefa foi realizada pela invenção como descrito abaixo e na seção de exemplos e como reivindicado nas reivindicações em anexo.

#### Sumário da Invenção

A invenção compreende um método de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas a) de fornecimento da amostra que será analisada, b) de incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico ao dito antígeno-alvo, em que um complexo antígeno-alvo-anticorpo terapêutico é formado com o antígeno-alvo total sendo complexado pelo anticorpo terapêutico e c) de detecção do complexo formado em b).

#### Descrição Detalhada da Invenção

Em uma primeira modalidade a presente invenção refere-se a um método de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas de a) fornecimento da amostra que será analisada, b) de incubação da dita amostra com o dito anticorpo tera-

pêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico com o dito antígeno-alvo, em que é formado um complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico e c) de detecção do complexo formado em b).

O termo "antígeno-alvo" refere-se a uma molécula biológica que é ligada por seu anticorpo terapêutico correspondente. Com a finalidade de exemplo, o antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico para HER2 (= ErbB2 ou p 185<sup>neu</sup>), como Herceptin<sup>®</sup> ou Omnitarg<sup>®</sup>, é HER2, de um anticorpo terapêutico para CD52, como Campath<sup>®</sup>, é CD52, de um anticorpo terapêutico para EGFr, como Erbitux<sup>®</sup>, é EGFr, de um anticorpo terapêutico para CD33, como Mylotarg<sup>®</sup>, é CD33, de um anticorpo terapêutico para Tag-72, como OncoScint<sup>®</sup>, é Tag-72, de um anticorpo terapêutico para 17-1A, como Pano-  
 10 rex<sup>®</sup>, é 17-1A, de um anticorpo terapêutico para CD20, como Rituxan<sup>®</sup>, MabThera<sup>®</sup> ou Zevalin<sup>®</sup>, é CD20 e de um anticorpo terapêutico para CD25, como Zenapax<sup>®</sup>, é CD25. O antígeno-alvo pode ser um antígeno-alvo solúvel, isto é, secretado ou expelido ou um antígeno-alvo ligado à membrana  
 15 (celular).

Em uma outra modalidade o dito complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico formado na etapa b) é formado com o antígeno-alvo total sendo complexado pelo anticorpo terapêutico.

O termo "antígeno-alvo solúvel" como utilizado dentro deste pedido de patente significa a forma solúvel, isto é, a forma secretada ou expelida, de um antígeno-alvo ligado à membrana de um anticorpo terapêutico. Os anticorpos terapêuticos são principalmente direcionados contra antígenos de superfície celular, por exemplo, de células cancerosas, aos quais se ligam.  
 20 Além da variação ligada à membrana de um antígeno de superfície celular, secretado ou expelido, isto é, solúvel, as variações de tal antígeno podem ser produzidas por células. O antígeno-alvo solúvel pode ser encontrado em fluidos corporais de um indivíduo afetado. O "antígeno-alvo solúvel" é a variação secretada ou expelida de um antígeno ligado à membrana, em que a  
 25 variação solúvel possui a mesma sequência de aminoácidos e a mesma estrutura secundária que pelo menos uma parte do domínio extracelular do antígeno ligado à membrana, permitindo assim que um anticorpo direciona-

do contra o domínio extracelular de um antígeno-alvo (ligado à membrana) também se ligue ao antígeno-alvo solúvel.

Em uma outra modalidade o dito antígeno-alvo é um antígeno-alvo solúvel.

5 O termo "epitopo" como utilizado dentro deste pedido de patente significa um determinante de proteína capaz de se ligar especificamente a um anticorpo. Os epitopos consistem geralmente em grupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares e possuem geralmente características estruturais tridimensionais específicas, assim como características específicas de carga. Os  
10 epitopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos pelo fato de que a ligação aos primeiros, mas não aos últimos é perdida na presença de solventes desnaturantes. Dependendo do tamanho do antígeno ao qual o epitopo pertence, mais de um epitopo por antígeno pode estar disponível  
15 resultando similarmente na possibilidade de mais de um sítio de ligação com o anticorpo (=epitopo) por antígeno.

Uma "amostra" de acordo com a presente invenção pode ser qualquer amostra de tecido ou de líquido removida do animal experimental, preferencialmente de um mamífero. Preferencialmente a amostra será uma  
20 amostra líquida como saliva, urina, sangue total, plasma ou soro. Preferencialmente a amostra será sangue total, plasma ou soro. Preferencialmente a amostra é uma amostra isenta de células, isto é, uma amostra que não contém células que carregam o antígeno-alvo ligado à membrana.

As condições que são apropriadas para a ligação de um antígeno-alvo ao seu "anticorpo terapêutico" correspondente são bem-conhecidas  
25 pelo versado na técnica e podem ser facilmente determinadas. Sob estas condições, o anticorpo terapêutico se liga ao antígeno-alvo, a variação ligada à membrana ou solúvel e é formado um complexo imunológico entre o antígeno-alvo e o anticorpo terapêutico, resultando em um complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico. Este complexo pode ser detectado através de  
30 quaisquer meios apropriados.

Em uma modalidade preferida um complexo de antígeno-alvo-

anticorpo terapêutico é detectado com o auxílio de um ensaio imunológico. O ensaio imunológico utilizado preferencialmente é um ensaio imunológico heterogêneo. É ainda preferido que a detecção do complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico seja realizada através do auxílio de um ensaio imunológico competitivo ou através do auxílio de um assim chamado ensaio imunológico em sanduíche.

O versado na técnica não terá problemas em montar um ensaio imunológico, que seja capaz de detectar o antígeno-alvo como estando presente no complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico. Com a finalidade de exemplo tal detecção pode ser realizada em um ensaio imunológico do tipo sanduíche em que um anticorpo é utilizado como um anticorpo de captura, que se liga ao antígeno-alvo em um epitopo que não se sobrepõe ao epitopo do anticorpo terapêutico. Para a detecção do complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico é preferido utilizar um segundo ou um anticorpo de detecção para o antígeno-alvo que se liga a um epitopo que não é reconhecido pelo anticorpo terapêutico nem pelo anticorpo de captura.

Preferencialmente é utilizado um anticorpo de detecção capaz de formar um complexo em sanduíche de anticorpo de detecção-antígeno-alvo-anticorpo terapêutico. O dito segundo ou anticorpo de detecção é preferencialmente marcado de tal maneira que a detecção direta ou indireta seja facilitada.

Para a detecção direta o grupo de marcação pode ser selecionado de quaisquer grupos de marcadores detectáveis conhecidos, tais como corantes, grupos marcadores luminescentes, tais como grupos quimioluminescentes, por exemplo, ésteres de acridínio ou dioxetanos ou corantes fluorescentes, por exemplo, fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina e derivados dos mesmos. Outros exemplos de grupos de marcação são complexos metálicos luminescentes, tais como complexos de rutênio ou de európio, enzimas, por exemplo, como utilizado para ELISA ou para CEDIA (Ensaio Imunológico com Doador de Enzima Clonada (Cloned Enzyme Donor Immunoassay), por exemplo, EP 0 061 888) e radioisótopos.

Os sistemas de detecção indireta compreendem, por exemplo,

que o reagente de detecção, por exemplo, o anticorpo de detecção, esteja marcado com um primeiro parceiro de um par de ligação "bioaffine". Os exemplos de pares de ligação adequados são haptenos ou antígeno/ anticorpo, biotina ou análogos da biotina tal como aminobiotina, iminobiotina ou destiobiotina/avidina ou estreptavidina, açúcar/lectina, ácido nucléico ou análogo de ácido nucléico/ácido nucléico complementar e receptor/ligante, por exemplo, receptor de hormônio esteróide/hormônio esteróide. Os primeiros membros de pares de ligação preferidos compreendem hapteno, antígeno e hormônio. São especialmente preferidos os haptenos como digoxina, digoxigenina e biotina e análogos das mesmas. O segundo parceiro de tal par de ligação, por exemplo, um anticorpo, estreptavidina etc., geralmente é marcado para permitir a detecção direta, por exemplo, através das marcações que são mencionadas anteriormente.

Os ensaios imunológicos são bem-conhecidos pelo versado na técnica. Os métodos para a realização de tais ensaios assim como as aplicações práticas e os procedimentos são resumidos em livros textos relacionados. Os exemplos de livros textos relacionados são Tijssen, P., *Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates*, em: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Burdon, R.H. e v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990) pp. 221-278; e vários volumes de *Methods in Enzymology*, Colowick, S.P. e Caplan, N.O. (eds.), Academic Press, dealing with immunological detection methods, especialmente ps volumes 70, 73, 74, 84, 92 e 121.

Em todos os métodos de detecção imunológica anteriores são escolhidas as condições reagentes que permitam a ligação dos reagentes empregados, por exemplo, para a ligação de um anticorpo ao seu antígeno correspondente. O complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico detectado de acordo com a presente invenção é correlacionado pelos procedimentos do estado da técnica à concentração correspondente do antígeno-alvo, na forma ligada à membrana ou na formulação solúvel.

O anticorpo ou os anticorpos que se ligam ao antígeno-alvo em um epitopo não reconhecido pelo anticorpo terapêutico pode ser um anticor-



po policlonal, um anticorpo monoclonal, fragmentos de tais anticorpos, assim como constructos genéticos que compreendem o domínio de ligação de tal anticorpo. Fragmentos de anticorpos apropriados também podem ser utilizados. Os anticorpos assim como os fragmentos de anticorpos são gerados  
5 através de procedimentos do estado da técnica, por exemplo, como descrito em Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990), o livro todo, especialmente pp. 43-78, Elsevier, Amsterdam).

O termo "anticorpo terapêutico" refere-se a qualquer preparação de anticorpo que seja pretendida para uso em um ser humano. Preferencialmente, tal anticorpo terapêutico será um anticorpo monoclonal. Adicionalmente preferido, tal anticorpo monoclonal será obtido de um macaco de grande porte ou será um anticorpo monoclonal humano ou um anticorpo humanizado. Preferencialmente, será um anticorpo monoclonal humano. Será também preferido que tal anticorpo monoclonal terapêutico seja um  
10 anticorpo monoclonal humanizado.  
15

O termo "monoclonal anticorpo" como utilizado aqui refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendidos na população sendo idênticos exceto por mutações que ocorrem naturalmente possíveis  
20 que podem estar presentes em quantidades mínimas. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste às preparações de anticorpos policlonais, que incluem anticorpos diferentes direcionados contra determinantes (epitopos) diferentes, cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um  
25 único determinante no antígeno. Em adição a sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo fato de que podem ser sintetizados de forma não contaminada por outros anticorpos. O modificador "monoclonal" indica a característica do anticorpo como sendo obtido partindo de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo através de qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais que serão utilizados  
30 de acordo com a presente invenção podem ser produzidos através do méto-

do de hibridoma descrito primeiro por Köhler, G. e outros, Nature 256 (1975) 495-497 ou podem ser produzidos através de métodos do DNA recombinante (ver, por exemplo, a US 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpos em fatos utilizando as técnicas descritas em Clackson, T. e outros, Nature, 352 (1991) 624-628 e Marks, J. D. e outros, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597, por exemplo.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, de roedores) são anticorpos quiméricos que contêm seqüências parciais derivadas de imunoglobulina não humana e de imunoglobulina humana. Para a maior parte, os anticorpos humanizados são derivados de uma imunoglobulina humana (anticorpo receptor) em que resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que possui a especificidade e a afinidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender modificações adicionais, por exemplo, resíduos de aminoácidos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Tais modificações resultam em variações de tal anticorpo receptor ou doador que são homólogas, mas não idênticas à seqüência original correspondente. Estas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àquelas de um anticorpo doador que não é humano e todas ou substancialmente todas as FRs são aquelas de um anticorpo receptor humano. O anticorpo humanizado compreenderá opcionalmente ainda pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana.

Os métodos para a humanização de anticorpos que não são humanos foram descritos na técnica. Preferencialmente, um anticorpo hu-

manizado possui um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos no mesmo provenientes de uma origem que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos que não são humanos são freqüentemente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente tirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e outros (Jones, P. T. e outros, *Nature* 321 (1986) 522- 525; Riechmann, L. e outros, *Nature* 332 (1988) 323-327; Verhoeyen, M. e outros, *Science* 239 (1988) 1534-1536; e Presta, L. G., *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 (1992) 593-596), através da substituição das seqüências hipervariáveis pelas seqüências correspondentes de um anticorpo humano. Conseqüentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (US 4.816.567), em que substancialmente menos que um domínio variável humano intacto foi substituído pela seqüência correspondente de uma espécie que não é humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos pelos resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, que serão utilizados na produção dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o assim chamado método de "melhor ajuste", a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor é verificada contra a biblioteca inteira de seqüências de domínios variáveis humanos conhecidas. A seqüência humana que estiver mais próxima à do roedor é então aceita como a região estrutural (FR) humana para o anticorpo humanizado (Sims, M. J. e outros, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; Chothia, C e outros, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917). Um outro método utiliza uma região estrutural particular derivada da seqüência consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter, P. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Presta, L. G. e outros, *J. Immunol.* 151

(1993) 2623-2632).

Imunoglobulinas podem ser geradas contra, por exemplo, polipeptídeos humanos, de camundongo ou de rato. As imunoglobulinas, policlonais ou monoclonais, que reconhecem especificamente o antígeno-alvo são abrangidas pela invenção. Tais imunoglobulinas são produzidas utilizando técnicas imunológicas padronizadas conhecidas por um versado na técnica. As imunoglobulinas podem ser policlonais ou monoclonais ou podem ser produzidas de forma recombinante tal como para um anticorpo humanizado. A determinação do fato de um anticorpo não se ligar ao mesmo epítopo como um anticorpo terapêutico conhecido pode ser facilmente realizada em um sistema de teste competitivo.

A sobreposição possível de epítopos de dois anticorpos que se ligam ao mesmo antígeno-alvo pode ser detectada com o auxílio de um sistema de teste competitivo. Para esta finalidade, por exemplo, com o auxílio de um ensaio imunológico enzimático, é testada a extensão até a qual o novo anticorpo compete com o anticorpo conhecido pela ligação a um antígeno-alvo imobilizado. Para esta finalidade, um antígeno-alvo imobilizado apropriadamente é incubado com o anticorpo conhecido na forma marcada e um excesso do anticorpo em questão. Através da detecção da marcação ligada pode ser facilmente determinada a extensão até a qual o anticorpo em questão pode deslocar o anticorpo conhecido do sítio de ligação (= epítopo). Se houver um deslocamento de não mais que 20%, preferencialmente de não mais que 10%, na mesma concentração ou a concentrações maiores, preferencialmente no caso de excesso do anticorpo em questão, referido como o anticorpo conhecido, então não está presente qualquer epítopo de sobreposição.

Os exemplos bem-conhecidos de anticorpos terapêuticos humanizados são os assim chamados anticorpos anti-ErbB2 incluindo huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como descrito na Tabela 3 da US 5.821.337 espressamente incorporada aqui como referência; assim como os anticorpos 520C9 humanizados (descritos na WO 93/21319) e 2C4

humanizado como descrito na PCT/US 03/21590.

Preferencialmente o anticorpo terapêutico utilizado em um método de acordo com a presente invenção é selecionado do grupo que consiste em Campath®, Erbitux®, Herceptin®, MabThera®, Mylotarg®, OncoScint®,  
5 Omnitarg®, Panorex®, Rituxan®, Zevalin® e Zenapax®, preferencialmente do grupo que consiste em Herceptin®, MabThera®, Omnitarg® e Zenapax®.

10 Zevalin® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como ibritumomab. Este anticorpo terapêutico se baseia no anticorpo monoclonal que se liga a CD20 e é aprovado pela FDA para o tratamento de linfoma sem ser de Hodgkins de células B.

Rituxan® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido com rituximab. Este anticorpo terapêutico se baseia no anticorpo monoclonal que se liga a CD20 e é aprovado pela FDA para o tratamento de linfoma sem ser de Hodgkins de células B.

15 Panorex® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como edrecolomab. Este anticorpo terapêutico se liga ao antígeno 17-1A (Ep-CAM) e foi aprovado para o tratamento de câncer colorretal.

20 OncoScint® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como satumomab. Este anticorpo terapêutico se liga ao antígeno Tag-72 de pancarcinoma e foi aprovado para o tratamento de carcinoma de cólon e ovariano.

25 Mylotarg® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como gemtuzmab. Este anticorpo terapêutico se baseia no anticorpo monoclonal que se liga a CD33 e é aprovado pela FDA para o tratamento de leucemia mielóide.

30 Erbitux® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como cetuximab. Este anticorpo terapêutico se liga ao receptor do fator de crescimento da epiderme (EGFr) e foi aprovado para câncer colorretal.

Campath® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como alemtuzumab. Este anticorpo terapêutico se baseia

no anticorpo monoclonal que se liga a CD52 e é aprovado pela FDA para o tratamento de leucemia linfocítica crônica.

Herceptin® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como trastuzumab. Este anticorpo terapêutico se baseia  
5 no anticorpo monoclonal 4D5. Se liga a HER2. HER2 é também conhecido como ErbB2 ou p 185<sup>neu</sup>. Foi mostrado que Herceptin® possui um efeito positivo sobre a sobrevivência de pacientes positivos em relação a HER2 com câncer de mama (De Laurentiis, M. e outros, Ann. Oncol. 16 (2005) iv7-iv13).

MabThera® é o nome comercial para o anticorpo terapêutico também conhecido como rituximab. Este anticorpo terapêutico se baseia no  
10 anticorpo monoclonal que se liga a CD20. Foi mostrado que MabThera® possui um efeito positivo sobre a sobrevivência de pacientes sofrendo de linfoma sem ser de Hodgkin insensível e agressivo (Di Bella, N. e outros, Cancer 103 (2005) 978-984).

15 Omnitarg® é o nome comercial para um novo anticorpo terapêutico pertuzumab que se liga a HER2. Se baseia no anticorpo monoclonal 2C4. 2C4 e 4D5 se ligam a epitopos diferentes em HER2. Omnitarg® está sendo atualmente submetido a testes clínicos. É esperado que tenha um efeito positivo sobre a sobrevivência para pacientes com superexpressão de  
20 HER2 com câncer de mama (Badache, A. e outros, Cancer Cell 5 (2004) 299-301).

Zenapax® é o nome comercial para um anticorpo terapêutico que se liga ao receptor de interleucina-2. Está associado com a menor rejeição e a maior sobrevivência de pacientes em receptores de transplantes re-  
25 nais (Morris, J.A. e outros, Clin. Transplant. 19 (2005) 340-345).

É também preferido que o antígeno-alvo detectado em um método de acordo com a presente invenção seja selecionado do grupo que consiste em HER2, receptor de interleucina-2, IGF-1R, EGFr, Tag-72, 17-1A, CD52, CD25, CD33 ou CD20, preferencialmente do grupo que consiste em  
30 HER2, receptor de interleucina-2, IGF-1R e CD20, preferencialmente do grupo que consiste em HER2, receptor de interleucina-2 ou CD20.

Como mencionado anteriormente foi descoberto pelos inventores

da presente invenção que não somente os anticorpos terapêuticos que se ligam a um epítipo que é também ligado por um anticorpo utilizado em um ensaio para a detecção do antígeno-alvo correspondente interferirão em tal ensaio. A interferência pode também ocorrer e foi observada em métodos de ensaio utilizando anticorpos para epítipos não sobrepostos no antígeno-alvo. As observações específicas apresentadas na seção de Exemplos foram realizadas com ensaios para o antígeno HER2 e dois anticorpos terapêuticos diferentes que se ligam a este antígeno-alvo. Entretanto, tinha que ser esperado que o mesmo se mantivesse verdadeiro na quantificação exata de outros antígenos-alvos. Os exemplos demonstram que o método de acordo com a presente invenção pode ser aplicado para ambos os anticorpos diferentes para HER2, isto é, Herceptin® e Omnitarg® e o antígeno-alvo HER2 pode ser medido de forma confiável independente da presença ou da ausência do anticorpo terapêutico correspondente na amostra investigada.

Em uma modalidade o anticorpo terapêutico é Herceptin®, o anticorpo de captura é Omnitarg® e o anticorpo de detecção é o anticorpo anti-ErbB2 7C2.

Em uma outra modalidade o anticorpo terapêutico é Omnitarg®, o anticorpo de captura é Herceptin® e o anticorpo de detecção é o anticorpo anti-ErbB2 7C2.

Herceptin®, Omnitarg® e o anticorpo anti-ErbB2 7C2 se ligam a epítipos diferentes do antígeno HER2. O anticorpo anti-ErbB2 7C2, por exemplo, reconhece um epítipo na região do terminal N de ErbB2 (ver, por exemplo, o WO 98/17797).

Em uma modalidade no método da invenção é formado o complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico formado na etapa b) em que o antígeno-alvo total na amostra está sendo complexado pelo anticorpo terapêutico.

A invenção compreende um método de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas a) de fornecimento da amostra que será analisada, b) de incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas

para a ligação do dito anticorpo terapêutico com o dito antígeno-alvo, em que um complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico é formado com o antígeno-alvo total sendo complexado pelo anticorpo terapêutico e c) de detecção do complexo formado em b).

5                   A medida confiável de um antígeno-alvo terá vantagem significativa para qualquer amostra que compreenda um anticorpo terapêutico interferente. Em uma modalidade preferida a presente invenção refere-se, portanto, a um método de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra em que o dito anticorpo terapêutico está presente que  
10                   compreende as etapas de a) fornecimento da amostra que será analisada, b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico ao dito antígeno-alvo, em que um complexo de antígeno-alvo- anticorpo terapêutico é formado e c) detecção do complexo formado em b).

15                   O método de acordo com a presente invenção será ainda muito útil no acompanhamento de pacientes que recebem um anticorpo terapêutico. Em uma modalidade preferida a presente invenção refere-se, portanto, a um método de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra obtida de um paciente sob terapia com o dito anticorpo tera-  
20                   pêutico que compreende as etapas de a) fornecimento da amostra que será analisada, b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico com o dito antígeno-alvo, em que um complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico é formado e c) detecção do complexo formado em b).

25                   A determinação correta do antígeno-alvo correspondente será, em uma modalidade preferida, útil para avaliar a eficiência da terapia. Em uma modalidade adicionalmente preferida o método de acordo com esta invenção irá auxiliar na avaliação de uma reincidência à doença oculta.

                  Em geral o médico pode descobrir uma informação valiosa no  
30                   acompanhamento de pacientes sob terapia com um anticorpo terapêutico através do uso do método apresentado aqui. A presente invenção refere-se ainda ao uso de um método como apresentado anteriormente no acompa-



nhamento de pacientes.

Sem desejar ficar ligado à explicação sugerida pode ser que a ligação de um anticorpo terapêutico ao seu antígeno-alvo tenha, por exemplo, alguma influência sobre a conformação de outros epitopos e/ou as propriedades de ligação de outros anticorpos a estes epitopos quando apresentados em um complexo de antígeno-alvo-anticorpo terapêutico. Preferencialmente o método de acordo com a presente invenção é utilizado mesmo se os epitopos em um antígeno-alvo para os anticorpos que são utilizados em um ensaio imunológico e para o anticorpo terapêutico, respectivamente, não se sobreponham.

Em uma modalidade o método da invenção é realizado em um chip.

Um "chip" é um material não poroso sólido, tal como metal, vidro ou plástico. O material pode ser opcionalmente revestido, inteiramente ou em certas áreas. Na superfície do material qualquer arranjo de pontos pode estar/está presente, visível ou em coordenadas. Em cada ponto pode estar imobilizado um polipeptídeo definido, com ou sem ligante ou espaçador na superfície do material. Preferencialmente os polipeptídeos imobilizados são pelo menos fragmentos de anticorpos que são capazes de se ligar ao antígeno-alvo.

Os exemplos e as figuras a seguir são fornecidos para auxiliar o entendimento da presente invenção, cujo âmbito real é apresentado nas reivindicações em anexo. É entendido que podem ser feitas modificações nos procedimentos apresentados sem sair do espírito da invenção.

## 25 Descrição das Figuras

Figura 1 - interferência de dois anticorpos terapêuticos diferentes na detecção de HER2 utilizando o ensaio comercial vendido pela Oncogene Sciences.

Figura 2 - interferência de dois anticorpos terapêuticos diferentes na detecção de HER2 utilizando o ensaio comercial vendido pela Bender.

Figura 3 - determinação da interferência máxima para o anticorpo terapêutico Omnitarg®.

Figura 4 - determinação da interferência máxima para o anticorpo terapêutico Herceptin®.

Figura 5 - curvas de calibração de detecção de HER2 utilizando ensaios isentos de interferência por Omnitarg® e Herceptin®, respectivamente.

#### Abreviações

	Bi	Biotina
	EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
	ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
10	Fcy (=Fcy)	Fragmento de Fc gama de uma imunoglobulina
	DIG (Dig)	Digoxigenina
	hu, H	Humano
	IgG	Imunoglobulina G
	n.d.	não definido
15	NSCLC	Câncer pulmonar sem ser de células pequenas
	DO	Densidade óptica
	MAK (=Mab)	Anticorpo monoclonal
	PAK (=Pab)	Anticorpo policlonal
	R	Vaca (Rind)
20	RPLA	Plasmaalbumina Bovina
	RT	Temperatura ambiente
	TAPS	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanossulfônico
	VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

#### Exemplo 1

##### 25 Ensaios Comerciais para HER2

a) HER-2/neu ELISA produzido pela Oncogene Science/Bayer Health Care LLC (Nº de Cat. DAKO Cytomation EL5011)

Incubações e etapas de lavagem foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Padrões de 35, 25, 15, 7,5, 2,5 e 0 ng/mL de HER2 foram salpicados com 500, 250, 0 µg/mL de Herceptin® ou foram salpicados com 500, 250, 0 µg/mL de Omnitarg®, respectivamente. Estas amostras foram incubadas na placa para microtitulação revestida. A-

pós a adição e a incubação do anticorpo de detecção, o substrato foi adicionado e absorbância foi lida em 492 nm. Os resultados são fornecidos na Tabela 1.

Tabela 1

5 Densidades ópticas (DOs) que são medidas com ou sem o anticorpo interferente na amostra

Padrão salpicado com	c(HER2) em ng/ml	DO em 492 nm	DO corri- gida com o branco	Diferença com os padrões não salpicados
Herceptin® 250 µg/ml	34,3	2,246	1,833	3,5%
Herceptin® 250 µg/ml	24,5	1,829	1,416	0,1%
Herceptin® 250 µg/ml	14,7	1,263	0,850	7,8%
Herceptin® 250 µg/ml	7,4	0,853	0,440	-3,0%
Herceptin® 250 µg/ml	2,5	0,580	0,167	-25,6%
Herceptin® 250 µg/ml	0	0,396	-0,017	n,d,
Herceptin® 500 µg/ml	33,6	2,184	1,771	6,8%
Herceptin® 500 µg/ml	24	1,726	1,313	7,3%
Herceptin® 500 µg/ml	14,4	1,204	0,791	14,2%
Herceptin® 500 µg/ml	7,2	0,798	0,385	9,8%
Herceptin® 500 µg/ml	2,4	0,514	0,101	24,1%
Herceptin® 500 µg/ml	0	0,395	-0,018	n,d,
Omnitarg® 250 µg/ml	34,3	2,056	1,643	13,5%
Omnitarg® 250 µg/ml	24,5	1,591	1,178	16,9%
Omnitarg® 250 µg/ml	14,7	1,106	0,693	24,8%
Omnitarg® 250 µg/ml	7,4	0,762	0,349	18,3%
Omnitarg® 250 µg/ml	2,5	0,524	0,111	16,5%
Omnitarg® 250 µg/ml	0	0,401	-0,012	n,d,
Omnitarg® 500 µg/ml	33,6	1,939	1,526	-6,0%
Omnitarg® 500 µg/ml	24	1,544	1,131	-15,7%
Omnitarg® 500 µg/ml	14,4	1,128	0,715	-34,3%
Omnitarg® 500 µg/ml	7,2	0,754	0,341	-38,1%
Omnitarg® 500 µg/ml	2,4	0,493	0,080	-19,4%
Omnitarg® 500 µg/ml	0	0,395	-0,018	n,d,
não salpicado	35	2,313	1,900	
não salpicado	25	1,830	1,417	

Padrão salpicado com	c(HER2) em ng/ml	DO em 492 nm	DO corri- gida com o branco	Diferença com os padrões não salpicados
não salpicado	15	1,335	0,922	
não salpicado	7,5	0,840	0,427	
não salpicado	2,5	0,546	0,133	
não salpicado (branco)	0'	0,413	0,000	

A diferença na recuperação do anticorpo HER2 causada pelo salpico do anticorpo terapêutico Omnitarg® é de até 38,1% e a causada pelo salpico de Herceptin® é de até 25,6%, respectivamente. A interferência por Omnitarg® e Herceptin® é também evidente partindo da Figura 1.

- 5 b) sp185<sup>HER-2</sup> Module Set (Ajuste de Módulo) fabricado pela Bender MedSystems (Nº de Cat. Biozol BMS207MST)

10 As incubações e as etapas de lavagem foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Padrões de 20, 10, 5, 2,5 e 0 ng/mL de HER2 foram salpicados com 500, 250, 0 µg/mL de Herceptin® ou foram salpicados com 500, 250, 0 µg/mL de Omnitarg®, respectivamente. Estas amostras foram incubadas na placa para microtitulação revestida. Após a adição e a incubação do anticorpo de detecção, o substrato foi adicionado e a absorbância foi lida em 405 nm. Os resultados são fornecidos na Tabela 2.

15

Tabela 2

Densidades ópticas (DOs) que são medidas com e sem o anticorpo terapêutico interferente na amostra

Padrão salpicado com	c(HER2) em ng/ml	DO em 405 nm	DO corri- gida com o branco	Diferença com os padrões não salpicados
Herceptin® 250 µg/ml	20	0,043	0,001	98,6%
Herceptin® 250 µg/ml	10	0,043	0,001	97,1%
Herceptin® 250 µg/ml	5	0,043	0,001	95,0%
Herceptin® 250 µg/ml	2,5	0,044	0,002	77,8%
Herceptin® 250 µg/ml	0	0,044	0,002	n,d,
Herceptin® 500 µg/ml	20	0,044	0,002	97,1%
Herceptin® 500 µg/ml	10	0,044	0,002	94,3%

Padrão salpicado com	c(HER2) em ng/ml	DO em 405 nm	DO corri- gida com o branco	Diferença com os padrões não salpicados
Herceptin® 500 µg/ml	5	0,043	0,001	95,0%
Herceptin® 500 µg/ml	2,5	0,044	0,002	77,8%
Herceptin® 500 µg/ml	0	0,044	0,002	n,d,
Omnitarg® 250 µg/ml	20	0,105	0,063	10,0%
Omnitarg® 250 µg/ml	10	0,071	0,029	17,1%
Omnitarg® 250 µg/ml	5	0,058	0,016	20,0%
Omnitarg® 250 µg/ml	2,5	0,051	0,009	0,0%
Omnitarg® 250 µg/ml	0	0,043	0,001	n,d,
Omnitarg® 500 µg/ml	20	0,103	0,061	12,9%
Omnitarg® 500 µg/ml	10	0,067	0,025	28,6%
Omnitarg® 500 µg/ml	5	0,059	0,017	15,0%
Omnitarg® 500 µg/ml	2,5	0,050	0,008	11,1%
Omnitarg® 500 µg/ml	0	0,044	0,002	n,d,
não salpicado	20	0,112	0,070	
não salpicado	10	0,077	0,035	
não salpicado	5	0,062	0,020	
não salpicado	2,5	0,051	0,009	
não salpicado (branco)	0	0,042	0,000	

A diferença na recuperação do antígeno HER2 causada pelo salpico com o anticorpo terapêutico Herceptin® é de até 98,6% e a causada por Omnitarg® de até 28,6%. Isto é também representado na Figura 2.

### Exemplo 2

#### 5                    Ensaio para a detecção de HER2 na presença de Omnitarg®

O ensaio foi realizado em chips de poliestireno revestidos com estreptavidina. O anticorpo para HER2 foi aplicado no chip na forma de linhas e aproximadamente dez gotículas de 250 pL. MAK<Her2>H-4D5-IgG-Bi (= monoclonal anticorpo biotinilado do clone 4D5 contra HER2) foi utilizado como um anticorpo de captura para estabelecer um ensaio sem a interferência por Omnitarg®. A concentração dos anticorpos biotinilados era de 100 µg/mL. Os chips foram armazenados a 4°C.

MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig (monoclonal anticorpo digoxigenila-

do do clone 7C2) foi utilizado como o anticorpo conjugado. A solução estoque deste conjugado foi armazenada a -20°C.

A proteína padronizada de HER2 sp185 (HER-2) (sHER2), era um produto disponível comercialmente (Biozol N° BMS207MST S) e foi armazenada a -20°C em uma concentração de 1000 ng/mL.

Foram utilizados como a amostra básica e o tampão do conjugado uma solução salina tamponada com fosfato (50 mM de dihidrogênio fosfato de sódio monohidratado, 150 mM de NaCl a pH 7), compreendendo azida sódica (0,09% de Na-azida) como um conservante e aditivos adicionais (0,035% de EDTA, 0,05% de Tween 20®, 2,00% de RPLA4 (Roche Nr. 1726544001), 0,10% de PAK<->R-IgG (Roche Nr. 1108750001), 100 µg/mL de camundongo-MAK-33-IgG-Poly (Roche Nr. 1939661001)). A amostra e o tampão do conjugado foram filtrados (tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenados a 4°C antes do uso.

A solução estoque do anticorpo terapêutico Omnitarg® rhuMAb 2C4 G186 CP R9805AX - produzido pela Genentech, Inc. - tinha uma concentração de 25 mg/mL e foi armazenada a 4°C.

Foi utilizado como o anticorpo de detecção MAK<Dig>M19-11-IgG conjugado com partículas de látex marcadas com fluorescência a 110 nm. A detecção do conjugado de anticorpo foi armazenada a 4°C.

Foi utilizado como o tampão de detecção um tampão de 50 mM de TAPS e 1 M de NaCl em pH 8,5, compreendendo azida sódica (0,09% de Na-azida) como um conservante e aditivos adicionais (0,05% de Tween 20®, 0,50% de RPLA4 (Roche Nr. 1726544001), 10 µg/mL de camundongo-MAK-33-IgG-Poly (Roche Nr. 1939661001)). O tampão de detecção foi filtrado (tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenado a 4°C antes do uso.

O tampão de lavagem era um tampão de 10 mM de Tris/HCl com pH 8,0 compreendendo 0,001% de Oxypyrion, 0,001% de MIT e 0,01% de Thesit. O tampão de lavagem foi filtrado (tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenado a 4°C antes do uso.

a) Detecção de uma interferência potencial por Omnitarg®

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente. Todos os reagen-

tes foram levados a esta temperatura antes do ensaio ser realmente realizado.

Uma amostra contendo 20 ng/mL de HER2 foi incubada com várias quantidades de Omnitarg® para resultar nas concentrações fornecidas na Figura 3. Estas amostras foram diluídas 1:5 em tampão de amostra. Duplicatas de 40 µL de cada amostra diluída são adicionadas nos chips e incubadas à temperatura ambiente durante 10 min. Depois disso, os chips são lavados através de uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo conjugado MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig foi diluído até 3 µg/mL em tampão do conjugado. 40 µL dos anticorpos conjugados diluídos foram adicionados em cada chip e incubados durante 5 min seguidos por uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo de detecção marcado foi diluído 1:5 em tampão de marcação (= detecção). 40 µL do anticorpo de detecção diluído são adicionados em cada chip e incubados durante 5 min. Após uma etapa de lavagem final a marcação ligada é quantificada utilizando um laser com uma excitação de 633 nm. Uma fotografia digital é convertida em contagens através de um software apropriado. Como pode ser observado partindo da Figura 3 o Omnitarg® (acima de uma concentração final de 25 µg/mL) interfere a uma extensão constante no ensaio acima.

#### 20 b) Medida de HER2 na presença de Omnitarg®

Para a medida de amostras que poderiam exibir interferência por Omnitarg® o ingrediente ativo deste fármaco (rhu Mab 2C4 G186 CP R9805AX) foi adicionado no tampão de amostra em uma concentração final de 6,25 µg/mL (= tampão de amostra (A)).

25 Para a preparação de amostras artificiais o material padronizado de HER2 foi diluído até 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2,5, 1 e 0 ng/mL, respectivamente, em soro de camundongo. Estas amostras foram diluídas 1:5 em tampão de amostra (A). Duplicatas de 40 µL de cada amostra diluída são adicionadas nos chips e incubadas à temperatura ambiente durante 10 min. Depois disso, os chips foram lavados através de uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo conjugado MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig foi diluído até 3 µg/mL no tampão do conjugado. 40 µL dos anticorpos conjugados dilu-

idos foram adicionados em cada chip e incubados durante 5 min seguidos por uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo de detecção marcado foi diluído 1:5 em tampão de detecção. 40 µL do anticorpo de detecção diluído são adicionados em cada chip e incubados durante 5 min. Após uma etapa de lavagem final a marcação ligada é quantificada utilizando um laser com uma excitação de 633 nm. Uma fotografia digital é convertida em contagens através de um software apropriado. As contagens são fornecidas na Tabela 3.

Tabela 3

10 Contagens obtidas com salpicos de MAK<Her2>H-4D5-IgG-Bi  
(curva de calibração no tampão de amostra amostra (A))

sHER2 em ng/ml	Contagens em Bi(4D5)
0	4
1	205
2.5	503
5	1064
10	3197
20	5201
50	16316
100	25107
200	38368
500	50449

Como pode ser observado partindo da Tabela 3, é facilmente possível estabelecer uma curva de calibração na presença de um nível básico de Omnitarg®.

15 Exemplo 3

Ensaio para a detecção de HER2 na presença de Herceptin®

O ensaio foi realizado em chips de poliestireno revestidos com estreptavidina. O anticorpo para HER2 foi aplicado no chip na forma de linhas de aproximadamente dez gotículas de 250 pL. MAK<Her2>H-2C4-IgG-Bi (= monoclonal anticorpo biotinilado do clone 2C4 contra HER2) foi utilizado para estabelecer um ensaio isento de interferência de Herceptin®. A con-



centração dos anticorpos biotinilados era de 100 µg/mL. Os chips foram armazenados a 4°C.

MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig (monoclonal anticorpo digoxigenilado do clone 7C2) foi utilizado como o anticorpo conjugado. A solução estoque deste conjugado foi armazenada a -20°C.

A proteína padronizada de HER2 sp185 (HER-2) (sHER2), era um produto disponível comercialmente (Biozol N° BMS207MST S) e foi armazenada a -20°C em uma concentração de 1000 ng/mL.

Foram utilizados como a amostra básica e o tampão do conjugado uma solução salina tamponada com fosfato (50 mM de dihidrogênio fosfato de sódio monohidratado, 150 mM de NaCl em pH 7), compreendendo azida sódica (0,09% de Na-azida) como um conservante e aditivos adicionais (0,035% de EDTA, 0,05% de Tween 20®, 2,00% de RPLA4 (Roche Nr. 1726544001), 0,10% de PAK<->R-IgG (Roche Nr. 1108750001), 100 µg/mL de camundongo-MAK-33-IgG-Poly (Roche Nr. 1939661001)). A amostra e o tampão do conjugado foram filtrados (tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenados a 4°C antes do uso.

A solução estoque da variação Mab4D5 humana do anticorpo terapêutico Herceptin - produzida pela Roche Diagnostics GmbH - tinha uma concentração de 25 mg/mL e foi armazenada a -20°C.

Foi utilizado como o anticorpo de detecção MAK<Dig>M19-11-IgG conjugado a partículas de látex marcadas com fluorescência em 110 nm. O conjugado do anticorpo de detecção foi armazenado a 4°C.

Foi utilizado como o tampão de detecção um tampão de 50 mM de TAPS e 1 M de NaCl em pH 8,5, compreendendo azida sódica (0,09% de Na-azida) como um conservante e aditivos adicionais (0,05% de Tween 20®, 0,50% de RPLA4 (Roche Nr. 1726544001), 10 µg/mL de camundongo-MAK-33-IgG-Poly (Roche Nr. 1939661001)). O tampão de detecção foi filtrado (tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenado a 4°C antes do uso.

O tampão de lavagem era um tampão de 10 mM de Tris/HCl com pH 8,0 compreendendo 0,001% de Oxypyrion, 0,001% de MIT e 0,01% de Thesit. O tampão de lavagem foi filtrado (tamanho de poro de 0,2 µm) e

armazenado a 4°C antes do uso.

a) Detecção de uma interferência potencial por Herceptin®

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente. Todos os reagentes foram levados a esta temperatura antes do ensaio se realmente realiza-

5 do.

Uma amostra contendo 20 ng/mL de HER2 foi incubada com várias quantidades de Herceptin® para resultar nas concentrações fornecidas na Figura 4. Estas amostras foram diluídas 1:5 em tampão de amostra. Duplicatas de 40 µL de cada amostra diluída são adicionadas nos chips e incubadas à temperatura ambiente durante 10 min. Depois disso, os chips são lavados através de uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo conjugado MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig foi diluído até 3 µg/mL no tampão do conjugado. 40 µL dos anticorpos conjugados diluídos foram adicionados em cada chip e incubados durante 5 min seguidos por uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo de detecção marcado foi diluído 1:5 no tampão de detecção. 40 µL do anticorpo de detecção diluído são adicionados em cada chip e incubados durante 5 min. Após uma etapa de lavagem final a marcação ligada é quantificada utilizando um laser com uma excitação de 633 nm. Uma fotografia digital é convertida em contagens através de um software apropriado. Como pode ser observado partindo da Figura 4 o Herceptin®

10

15

20

(acima de uma concentração de 25 µg/mL) interferia a uma extensão constante no ensaio anterior.

b) Medida de HER2 na presença de Herceptin®

Para a medida de amostras que poderiam exibir interferência pelo Herceptin® o ingrediente ativo deste fármaco (MAK<Herceptin> 7.4.04) foi adicionado no tampão de amostra em uma concentração final de 6,25 µg/mL (= tampão de amostra (B)). O tampão de amostra (B) foi filtrado (tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenado a 4°C antes do uso.

25

Para a preparação de amostras artificiais o material padronizado de HER2 foi diluído até 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2,5, 1 e 0 ng/mL, respectivamente, em soro de camundongo. Estas amostras foram diluídas 1:5 no tampão de amostra (B). Duplicatas de 40 µL de cada amostra diluída são

30

adicionadas nos chips e incubadas à temperatura ambiente durante 10 min. Depois disso, os chips são lavados através de uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo conjugado MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig foi diluído até 5 µg/mL no tampão do conjugado. 40 µL dos anticorpos conjugados diluídos foram adicionados em cada chip e incubados durante 5 min seguidos por uma etapa de lavagem automatizada. O anticorpo de detecção marcado foi diluído 1:5 no tampão de detecção. 40 µL do anticorpo de detecção diluído são adicionados em cada chip e incubados durante 5 min. Após uma etapa de lavagem final a marcação ligada é quantificada utilizando um laser com uma excitação de 633 nm. Uma fotografia digital é convertida em contagens através de um software apropriado. As contagens são fornecidas na Tabela 4.

Tabela 4

Contagens obtidas com salpicos de MAK<Her2>H-2C4-IgG-Bi (curva de calibração no tampão de amostra (B))

sHER2 em ng/ml	Contagens em Bi(2C4)
0	4
1	116
2.5	286
5	788
10	1975
20	3522
50	11541
100	18984
200	33293
500	48428

Como pode ser observado partindo da Tabela 4, é facilmente possível estabelecer uma curva de calibração para HER2 na presença de um nível básico de Herceptin®.

#### Exemplo 4

Medida de HER2 em uma amostra com e sem anticorpo terapêutico, respectivamente

Um grupo de soro de camundongos carregando o tumor KPL-4 (que é conhecido por produzir HER2) foi preparado e dividido em quatro alíquotas.

5 As alíquotas 1 e 2 foram diluídas 1:5 em tampão de amostra (B) e (A), respectivamente (= amostras não tratadas).

À alíquota 3 foi adicionado mais Herceptin® de forma que a concentração final fosse de 2000 µg/mL. Então esta foi diluída com o tampão de amostra (B) para também resultar no final em uma diluição de 1:5 como a alíquota 1 (= amostra tratada 3).

10 À alíquota 4 foi adicionado mais Omnitarg® de forma que a concentração final fosse de 2000 µg/mL. Então essa foi diluída com tampão de amostra (A) para também resultar no final em uma diluição de 1:5 como a alíquota 2 (= amostra tratada 4).

15 As amostras foram medidas como descrito nos exemplos 2b) e 3b), respectivamente. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5

Medida de uma amostra na presença de altos níveis de anticorpo terapêutico

Amostra/ "tratamento"	Tampão de amostra	Contagens nos salpicos de 2C4	Contagens nos salpicos de 4D5	Diferença entre amostra "não tratada" (1) e (2), respectivamente e amostra "tratada" (3) e (4), respectivamente
1 / não	B	23613		100%
2 / não	A		22758	100%
3/ Herceptin®	B	21383		90% = -10% de diferença
4 / Omnitarg®	A		21238	93% = -7% de diferença

20 Apesar das enormes quantidades de anticorpo terapêutico adicionadas, as diferenças entre as amostras não tratadas e tratadas não são maiores que 10%. Assim para ambos os fármacos Omnitarg® e Herceptin® poderia ser estabelecido um ensaio que funcionaria na presença de altas quantidades do anticorpo terapêutico correspondente.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas de
  - a) fornecimento da amostra que será analisada,
  - 5        b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico ao dito antígeno-alvo, através da qual é formado um complexo antígeno-alvo - anticorpo terapêutico e
  - c) detecção do complexo formado em (b).
- 10        2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a dita detecção é realizada através de um ensaio imunológico.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado adicionalmente pelo fato de que o dito ensaio imunológico é um ensaio imunológico em sanduíche.
- 15        4. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 até 3, caracterizado adicionalmente pelo fato de que o dito anticorpo terapêutico é um anticorpo humano ou um humanizado.
5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado adicionalmente pelo fato de que o dito anticorpo humano ou humanizado é um
- 20        anticorpo monoclonal.
6. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 até 5, em que o dito anticorpo terapêutico é selecionado do grupo que consiste em Avastin®, Herceptin®, MabThera®, Omnitarg® e Zenapax®.
7. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 até 5, em
- 25        que o dito antígeno-alvo é selecionado do grupo que consiste em HER2, CD20 e do receptor da interleucina-2.
8. Processo de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra em que o dito anticorpo terapêutico está presente compreendendo as etapas de
- 30        a) fornecimento da amostra que será analisada,
- b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico ao

dito antígeno-alvo, através da qual é formado um complexo antígeno-alvo - anticorpo terapêutico e

c) detecção do complexo formado em (b).

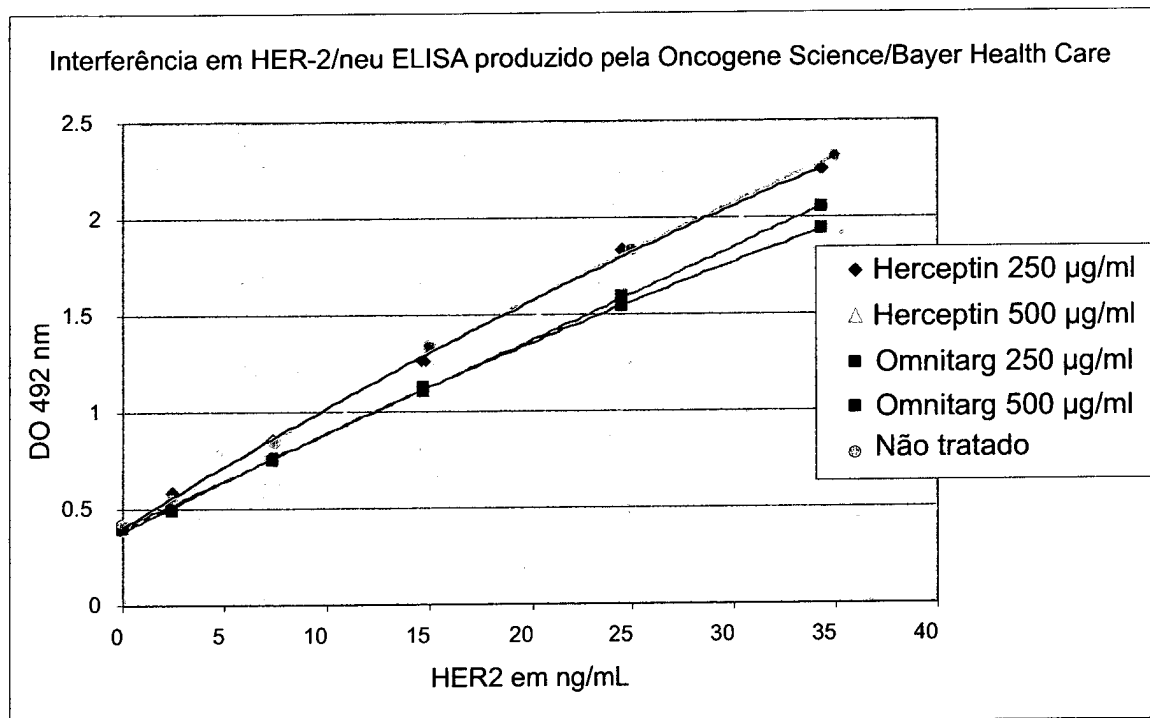
- 5 9. Processo de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra obtida de um paciente sob terapia com o dito anticorpo terapêutico que compreende as etapas de

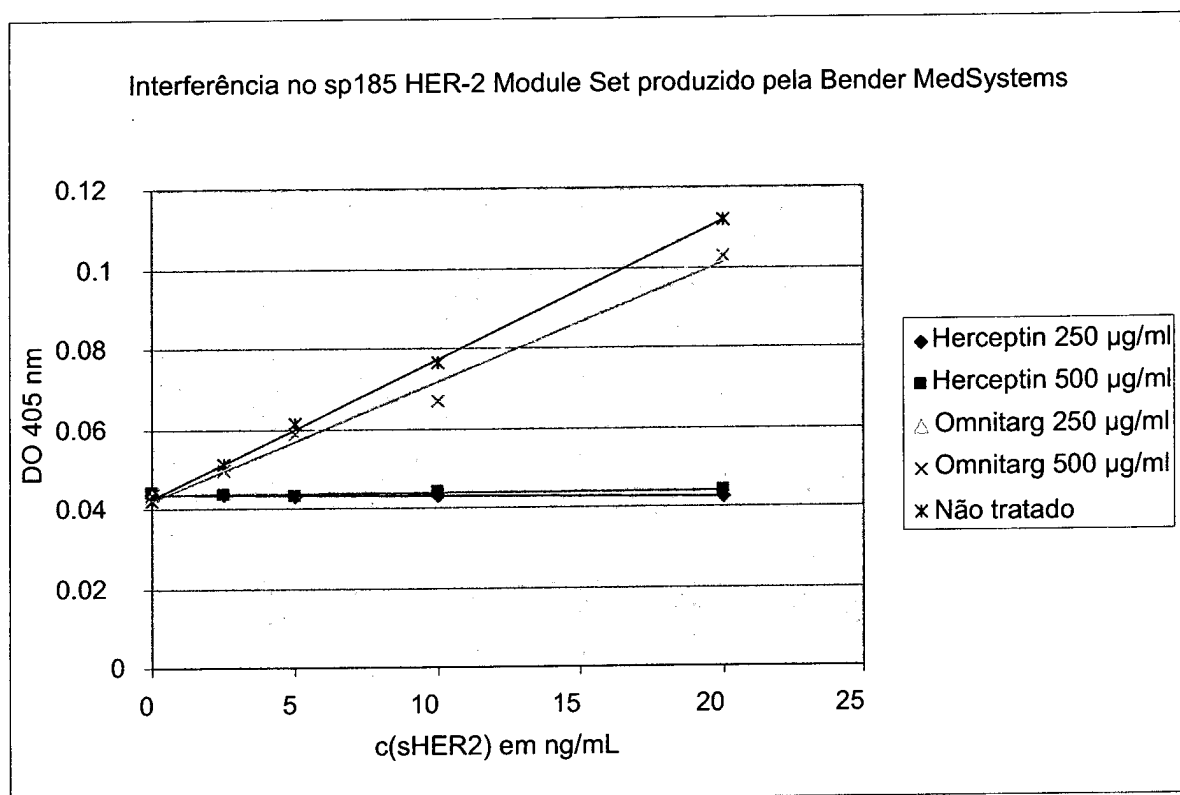
a) fornecimento da amostra que será analisada,

- b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico com  
10 o dito antígeno-alvo, através da qual é formado um complexo antígeno-alvo - anticorpo terapêutico e

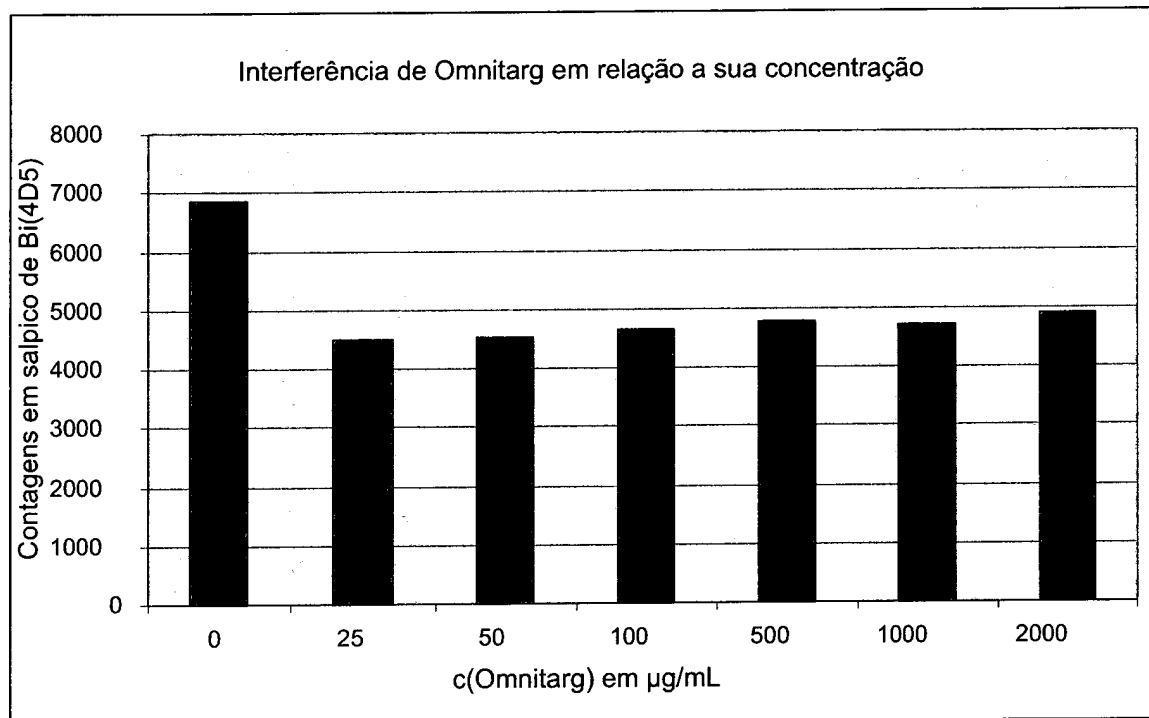
c) detecção do complexo formado em (b).

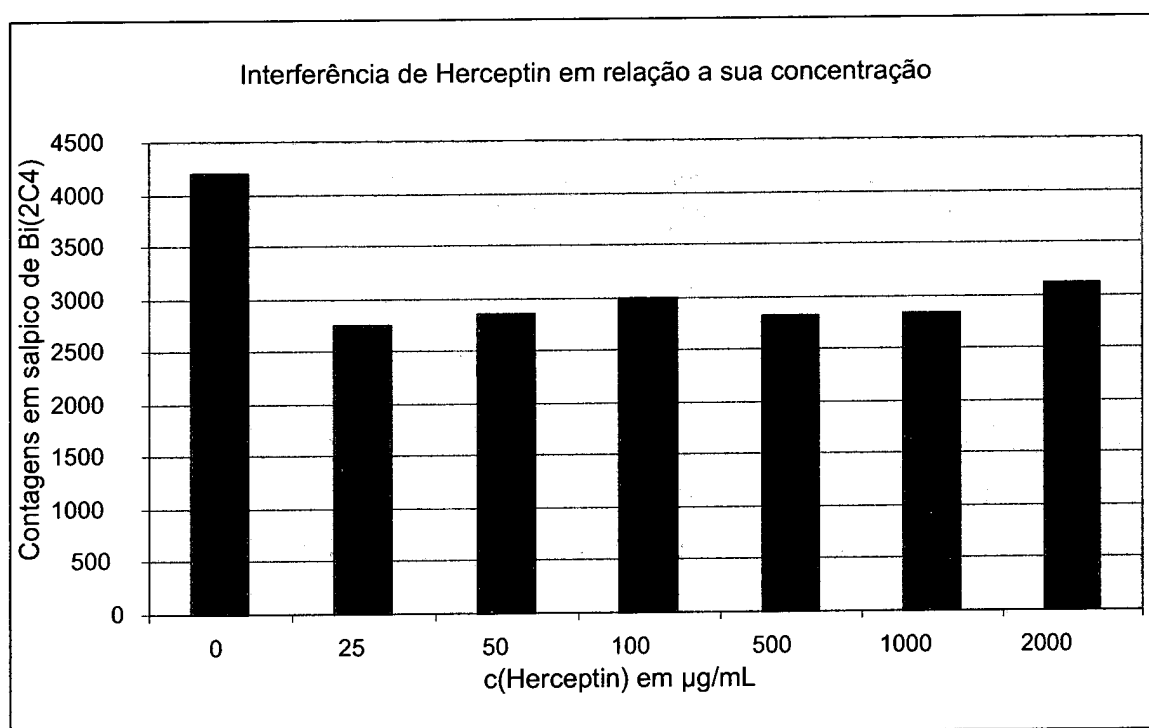
10. Uso de um processo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, no acompanhamento de pacientes.

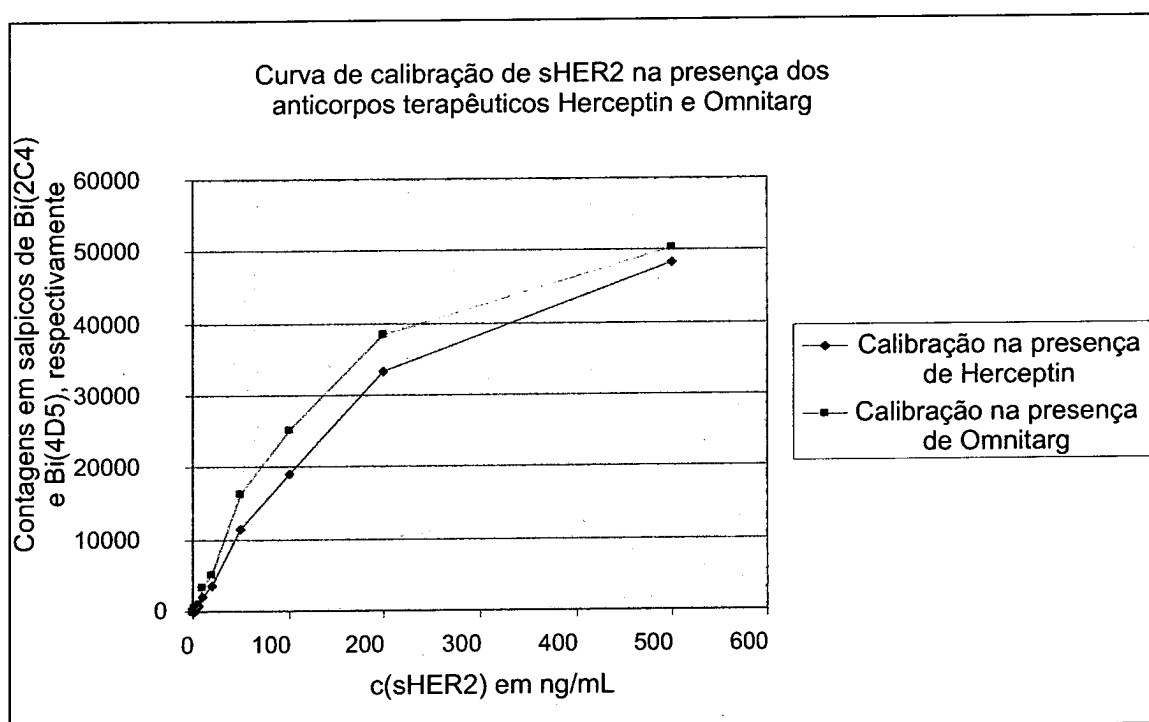
**Fig.1**

**Fig.2**



**Fig.3**

**Fig.4**

**Fig.5**

## RESUMO

Patente de Invenção: **"DETECÇÃO DE UM ANTÍGENO-ALVO INDEPENDENTEMENTE DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE UM ANTICORPO TERAPÊUTICO CORRESPONDENTE"**.

- 5                   A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos terapêuticos. A invenção refere-se especialmente a um processo de detecção do antígeno-alvo de um anticorpo terapêutico em uma amostra que compreende as etapas de a) fornecimento da amostra que será analisada, b) incubação da dita amostra com o dito anticorpo terapêutico sob condições apropriadas para a ligação do dito anticorpo terapêutico com o dito antígeno-alvo,
- 10                   através da qual é formado um complexo antígeno-alvo - anticorpo terapêutico e c) detecção do complexo formado em (b).