

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 463**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2018 PCT/EP2018/082664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019 WO19105916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2018 E 18804654 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3717916**

54 Título: **Ensayo de anticuerpos antifármaco con supresión de interferencia de la diana**

30 Prioridad:

29.11.2017 EP 17204316

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

09.04.2025

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DAHL, UWE;
JORDAN, GREGOR;
STAACK, ROLAND y
MOHEYSEN-ZADEH, MIRIAM**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 012 463 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de anticuerpos antifármaco con supresión de interferencia de la diana

- 5 La presente invención está en el campo de los ensayos de anticuerpos antifármaco. En el presente documento se informa de un ensayo de anticuerpos antifármaco con interferencia de la diana reducida del fármaco terapéutico.

Antecedentes de la invención

- 10 Moxness, M., *et al.* (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 1005 (2003) 265-268) informaron de ensayos de unión a radioligando para anticuerpos anti-insulina (IAB) totales y clase Ig. En primer lugar, se acidificaron los sueros de prueba y de control para disociar la insulina unida y se añadió carbón vegetal para adsorber la insulina sérica. Después de la neutralización, se retiró el carbón vegetal con la insulina unida del suero mediante centrifugación. Para cada ensayo, las muestras de suero con la insulina extraída se incubaron con insulina radiomarcada en presencia y ausencia de altos niveles de insulina no marcada para determinar la unión no específica y la unión total, respectivamente. Por tanto, Moxness *et al.* informaron de una comparación de dos protocolos de ensayo de ADA en los que se compararon la incubación durante la noche y la disociación ácida.

- 20 Patton, A., *et al.* (J. Immunol. Meth. 304 (2005) 189-195) informaron de un ELISA de doble captura que usa una superficie de antígeno de alta densidad acoplada covalentemente combinada con una etapa de disociación ácida para permitir la detección de anticuerpos en presencia de antígeno en suero humano, es decir, sin retirada previa del exceso de antígeno. Por tanto, Patton *et al.* informaron de un protocolo de ensayo en el que el exceso de antígeno no se retira antes del análisis del anticuerpo terapéutico. Los autores comparan las muestras pretratadas con ácido con muestras no pretratadas, pero con un procedimiento de ensayo de otro modo idéntico.

- 25 Lee, J.W., *et al.* (AAPS J. 13 (2011) 99-110) informan de que el impulsor predominante del bioanálisis para respaldar el desarrollo de fármacos es el uso previsto de los datos. Las metodologías fiables para las mediciones de mAb y su ligando antigénico (L) en circulación son fundamentales para la evaluación de las relaciones exposición-respuesta para respaldar las evaluaciones de eficacia y seguridad, y de la selección de dosis. Los ensayos de unión a ligando (LBA) se usan ampliamente para el análisis de biofármacos terapéuticos proteicos y ligandos antigénicos (L) para respaldar las evaluaciones de farmacocinética/farmacodinámica (FC/FD) y de seguridad. En particular, para fármacos de anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen de forma no covalente a L, pueden existir múltiples formas de mAb y L *in vivo*, incluyendo mAb libre, L libre y complejos mono y/o bivalentes de mAb y L. Dada la complejidad del equilibrio dinámico de unión que se produce en el cuerpo después de la dosificación y las múltiples fuentes de perturbación del equilibrio durante el bioanálisis, está claro que la cuantificación *ex vivo* de las formas de interés (mAb y L libres, unidos o totales) puede diferir de las reales *in vivo*. En principio, los reactivos LBA y los formatos de ensayo se pueden diseñar para medir las formas totales o libres de mAb y L. Sin embargo, la confirmación de las formas que se miden en las condiciones especificadas puede ser técnicamente complicada.

- 40 Kelly, M., *et al.* (AAPS J., 15 (2013) 646-658) informan de que un área que recientemente ha estado recibiendo cada vez más atención es la evaluación del análisis "libre" y "total" y el impacto del formato del ensayo en esas evaluaciones. Los autores proporcionan una revisión crítica de la literatura disponible y exploran prospectivamente procedimientos para mitigar el impacto potencial de los anticuerpos antifármaco en la medición del ensayo FC. Además, los procedimientos para incrementar la tolerancia a los fármacos en los ensayos de ADA (anticuerpos antifármaco) se podrían readaptar para evaluar o incrementar la tolerancia a ADA en los ensayos FC, normalmente con una etapa preparatoria para romper el inmunocomplejo y extraer el fármaco. Cabe señalar que la implementación de manipulaciones tan complicadas no se consideraría rutinaria para el bioanálisis clínico en una fase posterior, sino que proporcionaría información valiosa al comienzo de la fase de investigación del desarrollo del procedimiento para la interpretación de la farmacocinética. En última instancia, cualquier procedimiento de extracción usado para ayudar a cuantificar el fármaco probablemente daría como resultado una evaluación "total".

- 50 Davis, R.A., *et al.* (J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 897-901) informaron de un procedimiento para cuantificar la concentración total de biomarcador (libre más unido) en presencia de altos niveles de MoAb terapéutico usando un único MoAb no competitivo en un formato de captura/elución ácida. Este ensayo tiene la capacidad de detectar y cuantificar con exactitud niveles circulantes de biomarcadores de ng/ml en presencia de 200 µ/ml o más de MoAb terapéutico.

- 60 Salimi-Moosavi, H., *et al.* (J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 1128-1133) informaron de enfoques de tratamiento alcalino y ácido/guanidina para disociar la unión de proteínas y desnaturalizar preferentemente el ThA. Las proteínas antigénicas neutralizadas se pueden determinar mediante ELISA. Estos procedimientos proporcionan mediciones reproducibles de la proteína antigénica total sin interferencia de ThA. Las muestras de suero, los estándares y los controles de calidad que contenían proteína antigénica y ThA se trataron con un tampón alcalino (pH >13) que contenía caseína o un tampón ácido/guanidina (pH <1). Se midieron con éxito las proteínas antigénicas totales para dos sistemas ThA diferentes y se eliminaron completamente las interferencias mediante los tratamientos. Estos procedimientos se aplicaron con éxito al análisis en muestras de suero preclínicas.

Smith, H.W., *et al.* (Regul. Toxicol. Pharmacol. 49 (2007) 230-237) divulgaron la detección de anticuerpos contra proteínas terapéuticas en presencia de proteína terapéutica residual usando un tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida con disociación ácida (SPEAD) antes del ELISA.

5 Bourdage, J.S., *et al.* (J. Immunol. Meth. 327 (2007) 10-17) divulgaron un ensayo de elución por captura de afinidad (ACE) para la detección de anticuerpos antifármaco para tratamientos con anticuerpos monoclonales en presencia de altos niveles de fármaco.

10 Zoghbi, J., *et al.* (J. Immunol. Meth. 426 (2015) 62-69) divulgaron un procedimiento innovador y novedoso para resolver el problema de la interferencia del fármaco y de la diana en ensayos de inmunogenicidad que comprende cuatro componentes para la detección de ADA total (ADA libre y ADA unido al fármaco) en presencia del fármaco en muestras de pacientes: (1) usar un exceso de fármaco para saturar el ADA libre y formar ADA unido al fármaco como complejos fármaco-ADA, (2) precipitar el complejo usando un agente tal como PEG, (3) disociar con ácido el ADA del fármaco e inmovilizar (capturar) el ADA libre (y el fármaco libre) en condiciones ácidas (sin neutralización) sobre una superficie de gran capacidad, y (4) detectar el ADA libre (no el fármaco capturado) usando un reactivo de detección anti-Ig humana específico.

20 Bourdage, J.S., *et al.* (J. Immunol. Meth. 327 (2007) 10-17) divulgaron un ensayo de elución por captura de afinidad (ACE) para la detección de anticuerpos antifármaco para tratamientos con anticuerpos monoclonales en presencia de altos niveles de fármaco.

25 El estándar de referencia actual en los ensayos de anticuerpos antifármaco (ADA) es el ensayo de doble captura con el fármaco en ambos lados de un complejo formado que se detecta. Este parece ser el formato de ensayo apropiado para detectar los isotipos de ADA y la especificidad de ADA.

30 Collet-Brose, J., *et al.*, (J. Immunol. Res., ID de artículo 5069678 (2016)) divulgaron la evaluación de múltiples plataformas tecnológicas de inmunoanálisis para seleccionar el ensayo de anticuerpos antifármaco que presenta la tolerancia más apropiada al fármaco y a la diana. El objetivo de este estudio fue, en la fase de desarrollo del ensayo y, por tanto, con un apropiado grado de rigurosidad, seleccionar la plataforma tecnológica y el procedimiento de pretratamiento de muestras más apropiados para un ensayo clínico de ADA.

35 El documento WO 2008/031532 divulgó un anticuerpo que se une específicamente a IgG de macaco cangrejero caracterizado por no unirse a IgG humana, y un procedimiento para la determinación inmunológica de un inmunocomplejo (complejo DA/ADA) de un anticuerpo farmacológico (DA) y un anticuerpo contra dicho anticuerpo farmacológico (anticuerpo antifármaco, ADA) en una muestra de una especie de mono usando un inmunoanálisis de doble captura de doble antígeno. En el presente documento se usa un anticuerpo anti-IgG de macaco cangrejero específico que no se une de forma cruzada a IgG humana, con lo que este ensayo no se puede usar para analizar muestras humanas. Adicionalmente, la presencia de una diana terapéutica soluble no dará como resultado una señal positiva falsa en el ensayo como se informa en el documento WO 2008/031532.

45 El documento WO 2015/123315 divulgó ensayos para detectar la presencia o cantidad de un anticuerpo antifármaco que comprenden una etapa de precipitación que da como resultado una precipitación de inmunocomplejos (fármaco con ADA), seguida de una acidificación del precipitado que da como resultado una liberación de ADA de los complejos y una adsorción ácida del ADA en una superficie para una configuración final de complejos mensurables.

50 Llinares-Tello, F., *et al.* (BMJ 73 (2014) THU0166) divulgaron la utilidad de la disociación ácida en la detección de inmunogenicidad en pacientes en tratamiento con fármacos anti-TNF en un ensayo de ADA estándar. Wessels *et al.*, Bioanalysis, 8, pp. 2135-2145 (21016) describen otro procedimiento para detectar anticuerpos antifármaco usando la detección secundaria de Fc.

Sumario de la invención

55 En el presente documento se informa de un ensayo de anticuerpos antifármaco en el que se reduce, o incluso se elimina, el enmascaramiento del anticuerpo antifármaco por la diana (terapéutica) del fármaco.

60 En el presente documento se informa de un ensayo de anticuerpos antifármaco que es especialmente útil para muestras que comprenden el fármaco, su diana y anticuerpos antifármaco, en el que se reduce, o incluso se elimina, la interferencia de la diana (terapéutica) del fármaco.

65 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que se puede usar una etapa de incubación realizada al pH de la diana o a un valor de pH ácido antes de la detección del anticuerpo antifármaco para reducir la interferencia de la diana del anticuerpo (fármaco) terapéutico presente en una muestra de suero o plasma en un ensayo (de detección) de anticuerpos antifármaco. El ensayo de acuerdo con la presente invención es especialmente útil si la diana del fármaco terapéutico tiende a agregarse y provoca, de este modo, una unión no específica, y/o si la diana

es bivalente/multivalente y, de este modo, normalmente da como resultado una señal positiva falsa en el ensayo.

5 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que se puede reducir, o incluso eliminar, la interferencia de la diana (terapéutica) soluble del fármaco (anticuerpo terapéutico) presente en la muestra que se va a analizar en un inmunoanálisis usando dos o más etapas de disociación ácida en el procedimiento de ensayo.

10 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que se pueden usar las propiedades de precipitación/agregación de la diana (terapéutica) soluble en presencia de ADA y de fármaco para reducir la interferencia de la diana (terapéutica) soluble en un inmunoanálisis. La acidificación usada en general a valores de pH bajos aún da como resultado una señal (de fondo) alta que da como resultado una pérdida de sensibilidad (véase, por ejemplo, la figura 18). Se ha descubierto que, para mejorar la etapa de desactivación de la diana soluble / reducir la interferencia de la diana, no es necesario incluir una precipitación de inmunocomplejos en el procedimiento de ensayo. Se ha descubierto que se puede lograr una mejora en la sensibilidad del ensayo / reducción de la interferencia de la diana (terapéutica) soluble en un inmunoanálisis mediante la acidificación y neutralización sin ninguna separación y/o resuspensión del precipitado.

15 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que se puede usar una etapa de tratamiento ácido para retirar, es decir, precipitar, la diana soluble (por ejemplo, en/cerca de su punto isoeléctrico). El uso de dicha etapa de tratamiento ácido para retirar la diana (terapéutica) soluble en la muestra y para reducir la interferencia de la diana en un inmunoanálisis hace que el procedimiento de acuerdo con la presente invención sea, en general, aplicable. Sin estar limitado por esta teoría, se asume que el procedimiento de acuerdo con la presente invención es más adecuado para el análisis de muestras clínicas con respuesta inmunitaria desconocida, ya que se puede asumir que la diana (terapéutica) soluble está presente en cantidades comparables en diferentes individuos.

20 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que una incubación al pl de la diana soluble es ventajosa para mejorar el rendimiento de un inmunoanálisis, por ejemplo, para reducir la interferencia de la diana o para mejorar la sensibilidad del ensayo.

30 Se describe un inmunoanálisis para detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico se puede unir específicamente a una diana terapéutica, en una muestra de suero o plasma con interferencia de la diana reducida, que comprende las siguientes etapas (en el siguiente orden):

35 a) incubar un anticuerpo de captura inmovilizado con una muestra de suero o plasma, que comprende el fármaco, el anticuerpo diana y el anticuerpo antifármaco, para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco,

40 b) lavar el complejo formado en la etapa a) con un tampón que comprende un glúcido y un detergente, que tiene un valor de pH de aproximadamente el pl de la diana,

c) incubar durante 12 a 24 horas el complejo lavado de la etapa b) con un anticuerpo marcador conjugado con un marcador (detectable) para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador, (y)

45 d) detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco mediante la determinación del marcador (detectable) en el complejo formado en la etapa c).

En un modo de realización, el fármaco es un anticuerpo (anticuerpo farmacológico).

50 En un modo de realización, el anticuerpo marcador y el anticuerpo de captura son el anticuerpo farmacológico.

55 En un modo de realización, el inmunoanálisis comprende un anticuerpo de captura, un anticuerpo marcador y un anticuerpo de detección, en el que el anticuerpo de captura es el fármaco conjugado con un primer miembro de un par de unión, el anticuerpo marcador es el anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable y el anticuerpo de detección, que se conjuga además con una enzima, es un anticuerpo que se une específicamente al marcador detectable.

60 En un modo de realización, el anticuerpo de captura y/o el anticuerpo marcador se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en anticuerpo farmacológico completo/de longitud completa, F(ab')₂, Fab y scFv del anticuerpo farmacológico. En un modo de realización, el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcador son cada uno un anticuerpo farmacológico de longitud completa, o un F(ab')₂ del anticuerpo farmacológico, o un Fab del anticuerpo farmacológico.

65 En un modo de realización, el glúcido es un monosacárido, un disacárido o un trisacárido. En un modo de realización, el glúcido es un disacárido. En un modo de realización, el glúcido se selecciona del grupo de disacáridos que consiste en sacarosa, lactosa, maltosa, isomaltosa y trehalosa. En un modo de realización

ES 3 012 463 T3

preferente, el glúcido es sacarosa.

En un modo de realización, el glúcido tiene una concentración de aproximadamente un 6,5 % en peso.

5 En un modo de realización, el glúcido es sacarosa a una concentración de aproximadamente un 6,5 % en peso.

10 En un modo de realización, el detergente es un detergente no iónico. En un modo de realización, el detergente se selecciona del grupo de detergentes que consiste en éter de polialquilenglicol (nombre comercial Brij), monoésteres de polioxietilensorbitano (nombre comercial Tween), etoxilato de octilfenol (nombre comercial Trion o Nonident), octil-beta-glucósido, n-ácido graso-N-metil-D-glucamida (nombre comercial MEGA) y N,N'-bis-(3-D-gluconamidopropil)colamida (nombre comercial CHAP). En un modo de realización preferente, el detergente es dodecil éter de polietilenglicol.

15 En un modo de realización, el glúcido es sacarosa y el detergente es dodecil éter de polietilenglicol.

En un modo de realización, la incubación es durante 14 a 20 horas. En un modo de realización, la incubación es durante 15 a 17 horas. En un modo de realización, la incubación es durante aproximadamente 16 horas.

20 En un modo de realización, el glúcido es sacarosa, el detergente es dodecil éter de polietilenglicol y la incubación es durante 15 a 17 horas.

25 En un modo de realización, el primer miembro de un par de unión se selecciona del grupo que consiste en hapteno, antígeno y hormona. En un modo de realización, el par de unión es un par antígeno/anticuerpo o un par hapteno/anticuerpo anti-hapteno.

30 En un modo de realización, el par de unión se selecciona del grupo que consiste en biotina/(estrept)avidina, teofilina/anticuerpo anti-teofilina, 5-bromo-desoxiuridina/anticuerpo anti-5-bromo-desoxiuridina, digoxigenina/anticuerpo anti-digoxigenina y helicar/anticuerpo anti-helical. En un modo de realización, el par de unión es biotina y (estrept)avidina.

35 En un modo de realización, el fármaco es un anticuerpo anti-C5 y la diana es C5 humana.

En un modo de realización, el glúcido es sacarosa, el detergente es dodecil éter de polietilenglicol, el fármaco es un anticuerpo anti-C5 y la diana es C5 humana.

40 En un modo de realización, el glúcido es sacarosa, el detergente es dodecil éter de polietilenglicol, el fármaco es un anticuerpo anti-C5, la diana es C5 humana y el tampón tiene un valor de pH de aproximadamente 5,5 o aproximadamente 5,0.

45 En un modo de realización, la muestra es una muestra humana (muestra de suero o plasma humano).

Un aspecto como se informa en el presente documento es un inmunoanálisis para detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico se puede unir específicamente a una diana terapéutica, en una muestra de suero o plasma con interferencia de la diana reducida, que comprende las siguientes etapas:

50 a) incubar la muestra de suero o plasma a un valor de pH que es aproximadamente el valor de pI de la diana y, opcionalmente, retirar el precipitado formado después de la incubación,

b) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa a) a un valor de pH de aproximadamente 2 y, opcionalmente, centrifugar la muestra incubada para retirar el precipitado formado,

55 c) ajustar el valor de pH a aproximadamente 7,4, añadir anticuerpo de captura conjugado con un primer miembro de un par de unión y anticuerpo marcador conjugado con un marcador detectable a la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa b), e incubar la mezcla para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador, (y)

60 d) medir y/o determinar y/o cuantificar el complejo formado en la etapa c) y, de este modo, detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra de suero o plasma.

En un modo de realización, la etapa de medir y/o determinar y/o cuantificar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador (paso d)) comprende las etapas de

65 d1) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa c) con el segundo miembro del par de unión conjugado a una superficie sólida para capturar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo

ES 3 012 463 T3

antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie,

d2) detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco mediante la determinación del marcador detectable en el complejo formado en la etapa d1).

5 En un modo de realización, la incubación a aproximadamente el valor de pI de la diana es a un valor de pH en el intervalo de 0,5 unidades de pH por debajo del pI de la diana a 0,5 unidades de pH por encima del valor de pI de la diana.

10 En un modo de realización, la incubación en la etapa a) es con agitación.

En un modo de realización, la incubación en la etapa a) es durante 1,5 a 2,5 horas. En un modo de realización preferente, la incubación en la etapa a) es durante aproximadamente 2 horas.

15 En un modo de realización, la incubación en la etapa b) es durante aproximadamente 5 min.

En un modo de realización, la incubación en la etapa d) es durante aproximadamente 60 min.

20 En un modo de realización, el anticuerpo marcador y el anticuerpo de captura son el anticuerpo farmacológico.

En un modo de realización, el inmunoanálisis comprende un anticuerpo de captura, un anticuerpo marcador y un anticuerpo de detección, en el que el anticuerpo de captura es el fármaco conjugado con un primer miembro de un par de unión, el anticuerpo marcador es el anticuerpo farmacológico conjugado con un marcador detectable y el anticuerpo de detección, que se conjuga con una enzima, es un anticuerpo que se une específicamente al marcador detectable.

25 En un modo de realización, el anticuerpo de captura y/o el anticuerpo marcador se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en anticuerpo farmacológico completo/de longitud completa, $F(ab')_2$, Fab y scFv del anticuerpo farmacológico. En un modo de realización, el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcador son cada uno un anticuerpo farmacológico de longitud completa, o un $F(ab')_2$ del anticuerpo farmacológico, o un Fab del anticuerpo farmacológico.

30 En un modo de realización, el primer miembro de un par de unión se selecciona del grupo que consiste en hapteno, antígeno y hormona. En un modo de realización, el par de unión es un par antígeno/anticuerpo o un par hapteno/anticuerpo anti-hapteno.

35 En un modo de realización, el par de unión se selecciona del grupo que consiste en biotina/(estrept)avidina, teofilina/anticuerpo anti-teofilina, 5-bromo-desoxiuridina/anticuerpo anti-5-bromo-desoxiuridina, digoxigenina/anticuerpo anti-digoxigenina y helicar/anticuerpo anti-helical. En un modo de realización, el par de unión es biotina y (estrept)avidina.

40 En un modo de realización, el fármaco es un anticuerpo anti-C5 y la diana es C5 humana. En un modo de realización, el valor de pH en la etapa a) está en el intervalo de pH 4,7 a pH 5,5. En un modo de realización preferente, el valor de pH en la etapa a) es de aproximadamente pH 5,0 o aproximadamente pH 5,5.

45 En un modo de realización, el inmunoanálisis para detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico es un anticuerpo anti-C5 que se puede unir específicamente a C5 humana, en una muestra de suero o plasma con interferencia de la diana reducida, comprende las siguientes etapas:

50 a) incubar la muestra de suero o plasma a un valor de pH en el intervalo de 4,7 a 5,5 durante 1,5 a 2,5 horas y, opcionalmente, retirar el precipitado formado después de la incubación,

55 b) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa a) a un valor de pH de aproximadamente 2 durante aproximadamente 5 minutos y, opcionalmente, centrifugar la muestra incubada para retirar el precipitado formado,

60 c) ajustar el valor de pH a aproximadamente 7,4, añadir anticuerpo farmacológico de captura conjugado con biotina y anticuerpo farmacológico marcador conjugado con digoxigenina a la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa b), e incubar la mezcla para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador,

65 d) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa c) con (estrept)avidina conjugada a una superficie sólida para capturar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie, (y)

e) detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco determinando la digoxigenina en

el complejo formado en la etapa d) mediante incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante y, después de esto, incubación con HPPA o TMB, y detectando y/o determinando y/o cuantificando de este modo la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra de suero o plasma (correlacionando el complejo formado con la cantidad de ADA en la muestra).

5 En un modo de realización de todos los aspectos, la muestra es de un animal. En un modo de realización, el animal se selecciona de un ser humano y un animal de experimentación. En un modo de realización, la muestra es de un animal al que se le había administrado el fármaco antes de obtener la muestra. En un modo de realización, la muestra es de un paciente que necesita un tratamiento con el fármaco al que se le había administrado el fármaco antes de obtener la muestra. En ningún caso se vuelve a aplicar la muestra a un ser vivo después de que se haya realizado con la misma el procedimiento informado en el presente documento.

10 En un modo de realización de todos los aspectos, la muestra es una muestra humana (muestra de suero o plasma humano).

15 En un modo de realización de todos los aspectos, los complejos son complejos no covalentes.

En general, el inmunoanálisis comprende las siguientes etapas:

20 a) inmovilizar el anticuerpo de captura sobre una superficie sólida y, opcionalmente, lavar la superficie después de la etapa de inmovilización para retirar el anticuerpo de captura no unido y no específicamente unido,

25 b) incubar el anticuerpo de captura inmovilizado de la etapa a) con una muestra que contiene suero o plasma que, opcionalmente, se ha diluido para tener una concentración del anticuerpo antifármaco dentro del intervalo de detección del inmunoanálisis, para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco, y, opcionalmente, lavar la superficie después de la etapa de incubación para retirar la muestra no unida y no específicamente unida,

30 c) incubar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco de la etapa b) con un anticuerpo marcador marcado para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie después de la etapa de incubación para retirar el anticuerpo marcador no unido y no específicamente unido,

35 d) incubar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador de la etapa c) con un anticuerpo que se une específicamente al marcador del anticuerpo marcador conjugado con una enzima para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador-anticuerpo de detección y, opcionalmente, lavar la superficie después de la etapa de incubación para retirar el anticuerpo de detección no unido y no específicamente unido,

40 e) incubar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador-anticuerpo de detección de la etapa d) con un sustrato incoloro de la enzima que, tras la acción de la enzima sobre el sustrato, se convierte en un producto de reacción coloreado y determinar la densidad óptica después de un periodo de tiempo predefinido, (y)

45 f) correlacionar la densidad óptica determinada en la etapa e) con una curva de calibración y, de este modo, determinar la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra.

Descripción detallada de la invención

50 Para el análisis de anticuerpos terapéuticos (fármaco o, abreviado, D), así como de los respectivos anticuerpos contra el anticuerpo terapéutico (anticuerpo antifármaco o, abreviado, ADA), en muestras de origen *in vitro* o *in vivo*, es necesario un ensayo respectivo.

55 El ADA se une a su antígeno (*in vitro* e *in vivo*), es decir, el anticuerpo terapéutico/fármaco, y se forma un equilibrio entre el ADA libre y el fármaco libre, respectivamente, así como el fármaco mono y dicomplejado (asumiendo un fármaco monoespecífico bivalente). Este equilibrio es dinámico, es decir, el cambio en la concentración de un componente que participa en este equilibrio también cambia las concentraciones de todos los demás componentes que participan en este equilibrio.

60 Si bien la fracción de ADA libre, es decir, no unido, se correlaciona con la disponibilidad del fármaco para unirse y la capacidad de unión del ADA a su antígeno, es decir, el fármaco, *in vivo*, se puede usar la determinación del ADA total para caracterizar la interacción entre el ADA y el fármaco.

65 Para una evaluación farmacocinética completa de un fármaco, por ejemplo, es importante conocer la concentración de ADA, ya sea libre, es decir, capaz de unirse al fármaco, o en complejo con el fármaco, en la circulación sistémica. El ADA libre se puede evaluar como un biomarcador potencial.

Un ensayo para determinar el ADA en una muestra se puede ver afectado si el antígeno del fármaco está presente en la muestra. Para la evaluación farmacocinética, es importante la fracción de ADA que se puede unir o está unida al fármaco.

Los términos "anticuerpo terapéutico" y "fármaco" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Estos términos se usan en el sentido más amplio y engloban diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

En determinados modos de realización, el fármaco es un anticuerpo mono-específico. En un modo de realización, el fármaco es un anticuerpo mono-específico bivalente. En un modo de realización preferente, el fármaco es un anticuerpo monoclonal mono-específico bivalente.

En determinados modos de realización, el fármaco es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por un primer antígeno y la otra es por un segundo antígeno diferente. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes del mismo antígeno. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un primer y un segundo antígeno. En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico tiene i) una primera especificidad de unión que se une específicamente a un primer antígeno o un primer epítomo en un antígeno y ii) una segunda especificidad de unión que se une específicamente a un segundo antígeno o un segundo epítomo en el (mismo) antígeno. En un modo de realización, el segundo epítomo en el mismo antígeno es un epítomo no solapante. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico bivalente. En un modo de realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal biespecífico bivalente.

Se describen anticuerpos multiespecíficos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 o WO 2010/145793.

Las expresiones "anticuerpo anti-C5" y "un anticuerpo que se une (específicamente) a C5" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a C5 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a C5. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-C5 a una proteína distinta de C5 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a C5. En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-C5 se une a un epítomo de C5 que se conserva entre C5 de especies diferentes. En un modo de realización preferente, la C5 es C5 humana.

El término "C5", como se usa en el presente documento, engloba cualquier C5 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). A menos que se indique de otro modo, el término "C5" se refiere a una proteína C5 humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30 y que contiene la secuencia de cadena beta mostrada en SEQ ID NO: 31. El término engloba C5 no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de C5 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de C5, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una C5 humana ejemplar se muestra en SEQ ID NO: 30 (C5 "natural" o "wt"). La secuencia de aminoácidos de una cadena beta ejemplar de C5 humana se muestra en SEQ ID NO: 31. Las secuencias de aminoácidos de los dominios MG1, MG2 y MG1-MG2 ejemplares de la cadena beta de C5 humana se muestran en SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de C5 de macaco cangrejero y murino ejemplares se muestran en SEQ ID NO: 35 y 96, respectivamente. Los residuos aminoacídicos 1-19 de SEQ ID NO: 30, 31, 34, 35 y 96 corresponden a una secuencia señal que se retira durante el procesamiento en la célula y, por tanto, falta en la secuencia de aminoácidos ejemplar correspondiente.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítomo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiera la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente

invencción se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a, el procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que usan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Los principios de diferentes inmunoanálisis se describen, por ejemplo, por Hage, D.S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R). Lu, B., *et al.* (Analyst 121 (1996) 29R-32R) informan de la inmovilización orientada de anticuerpos para el uso en inmunoanálisis. Se informa de inmunoanálisis mediados por avidina-biotina, por ejemplo, por Wilchek, M. y Bayer, E.A., en *Methods Enzymol.* 184 (1990) 467-469.

Los anticuerpos monoclonales y sus dominios constantes contienen varias cadenas laterales de aminoácidos reactivas para conjugarse con un miembro de un par de unión, tal como un polipéptido/proteína, un polímero (por ejemplo, PEG, celulosa o poliestirol) o una enzima. Los grupos reactivos químicos de aminoácidos son, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteínas y metioninas), grupos ácido carboxílico (ácidos aspárticos, ácidos glutámicos) y grupos alditol. Dichos procedimientos, por ejemplo, se describen por Aslam M. y Dent, A., en "Bioconjugation", MacMillan Ref. Ltd. 1999, páginas 50-100.

Uno de los grupos reactivos más comunes de los anticuerpos es el ϵ -amino alifático del aminoácido lisina. En general, prácticamente todos los anticuerpos contienen abundante lisina. Las aminas de lisina son nucleófilos razonablemente buenos por encima de pH 8,0 ($pK_a = 9,18$) y, por lo tanto, reaccionan fácil y limpiamente con una variedad de reactivos para formar enlaces estables. Los compuestos reactivos con amina reaccionan principalmente con lisinas y los grupos α -amino de proteínas. Los ésteres reactivos, en particular ésteres de N-hidroxi-succinimida (NHS), están entre los reactivos empleados más comúnmente para la modificación de grupos amina. El pH óptimo para la reacción en un entorno acuoso es pH 8,0 a 9,0. Los isotiocianatos son reactivos de modificación de amina y forman enlaces tiourea con proteínas. Reaccionan con aminas proteicas en solución acuosa (óptimamente a pH 9,0 a 9,5). Los aldehídos reaccionan en condiciones acuosas suaves con aminas alifáticas y aromáticas, hidracinas e hidracidas para formar un intermedio imina (base de Schiff). Se puede reducir selectivamente una base de Schiff con agentes reductores suaves o fuertes (tales como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio) para obtener un enlace alquilamina estable. Otros reactivos que se han usado para modificar aminas son anhídridos de ácido. Por ejemplo, el anhídrido dietilentriaminopentaacético (DTPA) es un agente quelante bifuncional que contiene dos grupos anhídrido reactivos con amina. Puede reaccionar con grupos N terminales y ϵ -amino de aminoácidos para formar enlaces amida. Los anillos de anhídrido se abren para crear brazos quelantes de metal multivalentes que se pueden unir firmemente a metales en un complejo de coordinación.

Otro grupo reactivo común en los anticuerpos es el residuo tiol del aminoácido que contiene azufre cistina y su producto de reducción cisteína (o semi-cistina). La cisteína contiene un grupo tiol libre, que es más nucleófilo que las aminas y, en general, es el grupo funcional más reactivo en una proteína. Los tioles son, en general, reactivos a pH neutro y, por lo tanto, se pueden acoplar selectivamente a otras moléculas en presencia de aminas. Puesto que los grupos sulfhidrilo libres son relativamente reactivos, las proteínas con estos grupos a menudo existen con ellos en su forma oxidada como grupos disulfuro o enlaces disulfuro. En dichas proteínas, se requiere la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditiotreitól (DTT) para generar el tiol libre reactivo. Los compuestos reactivos con tiol son los que se acoplarán a los grupos tiol en polipéptidos, formando productos acoplados con tioéter. Estos reactivos reaccionan rápidamente a pH ligeramente ácido a neutro y, por lo tanto, se pueden hacer reaccionar selectivamente en presencia de grupos amina. La literatura informa del uso de varios reactivos de reticulación tiolantes, tales como el reactivo de Traut (2-iminotiolano), (acetil)tiolacetato de succinimidilo (SATA) y 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-LC-SPDP) para proporcionar maneras eficaces de introducir múltiples grupos sulfhidrilo por medio de grupos amino reactivos. Los derivados de haloacetilo, por ejemplo, yodoacetamidas, forman enlaces tioéter y también son reactivos para la modificación con tiol. Otros reactivos útiles son las maleimididas. La reacción de maleimididas con reactivos reactivos con tiol es esencialmente la misma que con yodoacetamidas. Las maleimididas reaccionan rápidamente a pH ligeramente ácido a neutro.

Otro grupo reactivo común en los anticuerpos son los ácidos carboxílicos. Los anticuerpos contienen grupos ácido carboxílico en la posición C terminal y dentro de las cadenas laterales del ácido aspártico y ácido glutámico. La reactividad relativamente baja de los ácidos carboxílicos en agua normalmente hace difícil el uso de estos grupos para modificar selectivamente polipéptidos y anticuerpos. Cuando se hace esto, el grupo ácido carboxílico normalmente se convierte en un éster reactivo por el uso de una carbodiimida soluble en agua y se hace reaccionar con un reactivo nucleófilo tal como una amina, hidracida o hidracina. El reactivo que contiene amina debe ser una base débil para reaccionar selectivamente con el ácido carboxílico activado en presencia de las ϵ -aminas más altamente básicas de lisina para formar un enlace amida estable. Se puede producir la reticulación proteica cuando el pH se eleva por encima de 8,0.

Se puede usar peryodato de sodio para oxidar la parte de alcohol de un glúcido dentro de un resto glucídico fijado a un anticuerpo a un aldehído. Se puede hacer reaccionar cada grupo aldehído con una amina, hidracida o hidracina como se describe para los ácidos carboxílicos. Puesto que el resto glucídico se encuentra

predominantemente en la región del fragmento cristalizante (región Fc) de un anticuerpo, se puede lograr la conjugación a través de la modificación dirigida al sitio del carbohidrato lejos del sitio de unión a antígeno. Se forma un intermedio de base de Schiff, que se puede reducir a una alquilamina a través de la reducción del intermedio con agentes reductores solubles en agua de cianoborohidruro de sodio (suave y selectivo) o borohidruro de sodio (fuerte).

La conjugación de un anticuerpo marcador y/o de captura y/o de detección con su ligando de conjugación se puede realizar mediante diferentes procedimientos, tales como unión química, o unión a través de un par de unión. El término "ligando de conjugación", como se usa en el presente documento, indica, por ejemplo, soportes sólidos, polipéptidos, marcadores detectables, miembros de pares de unión específicos. En un modo de realización, se realiza la conjugación del anticuerpo de captura y/o marcador y/o de detección a su ligando de conjugación uniéndose químicamente por medio de grupos N terminal y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólico de la cadena principal aminoacídica del anticuerpo y/o grupos aldol de la estructura de carbohidrato del anticuerpo. En un modo de realización, el anticuerpo de captura se conjuga con su ligando de conjugación a través de un par de unión. En un modo de realización preferente, el anticuerpo de captura se conjuga con biotina y se realiza la inmovilización en un soporte sólido por medio de avidina o estreptavidina inmovilizada en un soporte sólido. En un modo de realización, el anticuerpo de captura se conjuga con su ligando de conjugación a través de un par de unión. En un modo de realización preferente, el anticuerpo marcador se conjuga con digoxigenina mediante un enlace covalente como marcador detectable.

El término "muestra" incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o ser anteriormente vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero no están limitados a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. En un modo de realización, la muestra se obtiene de un mono, especialmente un macaco cangrejero, o un conejo, o un ratón o rata, o un ser humano. En un modo de realización preferente, la muestra es una muestra de un humano. Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, en un modo de realización, sangre entera, plasma o suero de un individuo, que son las fuentes de muestra más ampliamente usadas en la rutina clínica.

El término "fase sólida" indica una sustancia no fluida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y microesferas) preparadas a partir de materiales tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias en gel tales como geles de sílice, alúmina y poliméricos; capilares, que se pueden preparar con polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microvaloración; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros recipientes de muestra para espectrómetro. Un componente de fase sólida se distingue de las superficies sólidas inertes por que una "fase sólida" contiene al menos un resto en su superficie, que está destinado a interactuar con una sustancia en una muestra. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta o placa de microvaloración, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como microesferas y micropartículas. Se puede usar una variedad de micropartículas que permiten la fijación no covalente o bien covalente de proteínas y otras sustancias. Dichas partículas incluyen partículas poliméricas, tales como poliestireno y poli(metacrilato de metilo); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, vidrio y óxido de metal. Véase, por ejemplo, Martin, C.R., *et al.*, Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327A, o Butler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23.

Los cromógenos (grupos y tintes fluorescentes o luminiscentes), las enzimas, los grupos o partículas metálicas activos en RMN, los haptenos, por ejemplo, la digoxigenina, son ejemplos de "marcadores detectables". El marcador detectable también puede ser un grupo de reticulación fotoactivable, por ejemplo, un grupo ácido o acirina. Los quelatos metálicos que se pueden detectar mediante electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales preferentes, dándose particular preferencia a quelatos de rutenio, por ejemplo, un quelato de rutenio (bispiridilo)₃²⁺. Los grupos marcadores de rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138. Para la detección directa, el grupo marcador se puede seleccionar de cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, tales como tintes, grupos marcadores luminiscentes tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dióxetanos, o tintes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxacina, resorufina, cianina y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos marcadores son complejos metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo, como las usadas para ELISA o para CEDIA (inmunoanálisis con donante de enzima clonada, por ejemplo, el documento EP-A-0 061 888) y radioisótopos.

Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo, el anticuerpo de detección, se marque con un primer miembro de un par de unión. Los ejemplos de pares de unión adecuados son antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, glúcido/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. En un modo de realización preferente, los primeros miembros de pares de unión comprenden hapteno, antígeno y hormona. En un modo de realización preferente, el hapteno se selecciona del grupo que consiste en digoxina, digoxigenina y biotina y análogos de los mismos. El segundo miembro de dicho par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., se marca normalmente para permitir la detección directa, por ejemplo, por los marcadores

como se menciona anteriormente.

El término "inmunoanálisis" indica cualquier técnica que utiliza moléculas de unión específica, tales como anticuerpos, para capturar y/o detectar una diana específica para realizar ensayo cualitativos o cuantitativos. En general, un inmunoanálisis se caracteriza por las siguientes etapas: 1) inmovilización o captura del analito y 2) detección y medición del analito. El analito se puede capturar, es decir, unir a, sobre cualquier superficie sólida, tal como, por ejemplo, una membrana, una placa de plástico o alguna otra superficie sólida.

Los inmunoanálisis se pueden realizar, en general, en tres formatos diferentes. Uno es con detección directa, otro con detección indirecta o mediante un ensayo de tipo sándwich. El inmunoanálisis de detección directa usa un anticuerpo de detección (o marcador) que se puede medir directamente. Una enzima u otra molécula permite la generación de una señal que producirá un color, fluorescencia o luminiscencia que permitirá visualizar o medir la señal (también se pueden usar radioisótopos, aunque no se usan comúnmente en la actualidad). En un ensayo indirecto se usa un anticuerpo principal que se une al analito para proporcionar una diana definida para un anticuerpo secundario (anticuerpo marcador) que se une específicamente a la diana proporcionado por el anticuerpo principal (denominado anticuerpo detector o marcador). El anticuerpo secundario genera la señal mensurable. El ensayo de tipo sándwich usa dos anticuerpos, un anticuerpo de captura y un anticuerpo marcador (detector). El anticuerpo de captura se usa para unir (inmovilizar) el analito de la solución o unirse a él en solución. Esto permite retirar específicamente el analito de la muestra. El anticuerpo marcador (detector) se usa en una segunda etapa para generar una señal (ya sea directa o indirectamente como se describe anteriormente). El formato de tipo sándwich requiere dos anticuerpos, cada uno con un epítipo distinto en la molécula diana. Además, no deben interferir entre sí, ya que ambos anticuerpos se deben unir a la diana al mismo tiempo.

Modos de realización del procedimiento de acuerdo con la invención

La interferencia de un fármaco en un ensayo de ADA es un fenómeno en general conocido, pero no la interferencia de la diana del fármaco en un ensayo de ADA.

En general, después de la disociación ácida, una etapa de neutralización sigue a la disociación ácida o básica para permitir que los compañeros de unión formen puentes nuevamente, provocando que el factor de interferencia, si aún existe en solución, se vuelva a unir también, manteniendo el problema.

Se han usado muchos enfoques para mitigar este problema, tales como la disociación ácida o básica, la inhibición competitiva de la interferencia usando anticuerpos específicos, la retirada de los factores de interferencia, la extracción en fase sólida con disociación ácida (SPEAD), la elución por captura por afinidad (ACE) y muchos otros. El uso de la disociación ácida en un ensayo de doble captura ha mostrado cierta mejora en la tolerancia a los fármacos para la detección de ADA (véase, por ejemplo, Moxness, M., *et al.*, Clin. Chem. 51 (10), 1983; Patton, A., *et al.*, J. Immunol. Methods 304 (2005) 189).

La precipitación con PEG de la molécula diana o del inmunocomplejo se basa en el tamaño (o peso molecular, MW) y depende de la concentración de PEG. Cuanto mayores sean las concentraciones de PEG, menores serán los MW de las dianas que precipitarán. Para reducir la precipitación de proteínas séricas no específicas, tales como albúmina e inmunoglobulina, se usa una concentración baja de PEG para precipitar inmunocomplejos ADA:fármaco de gran MW. El uso del principio de precipitación, acoplado con la disociación ácida y la captura sobre una superficie de alta capacidad en condiciones ácidas (evitando que los compañeros de unión se vuelvan a unir), permite la detección específica de ADA o fármaco o diana farmacológica usando reactivos de detección específicos.

La disociación ácida se usa comúnmente para romper los complejos fármaco-ADA y, por tanto, liberar el ADA de dichos inmunocomplejos. El ADA liberado (libre) puede formar complejos con el anticuerpo de detección en una etapa posterior. La etapa de disociación ácida puede acortar el tiempo total del ensayo en comparación con un ensayo de ADA clásico (sin etapa de disociación ácida). En general, la atención se centra en la sensibilidad comparable.

En general, un ensayo de ADA estándar tiene la desventaja de un prolongado tiempo de incubación para lograr el nuevo equilibrio entre el ADA y los reactivos en presencia de fármaco residual. Si se aplica un tiempo de incubación corto, solo se puede obtener una baja tolerancia al fármaco (= baja sensibilidad con fármaco residual).

La formación de los complejos mensurables lleva tiempo y depende de la constante de velocidad de asociación del ADA a los reactivos. Para el ensayo de ADA estándar, la constante de velocidad de disociación de los inmunocomplejos es la etapa limitante de tiempo. Por este motivo, se aplican tiempos de incubación más largos (normalmente durante la noche) a la incubación de la muestra y los reactivos.

Por tanto, la disociación ácida es, predominantemente, un procedimiento de disociación del complejo.

Un aspecto de acuerdo con la presente invención es un inmunoanálisis para detectar y/o determinar y/o cuantificar

la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico se puede unir específicamente a una diana terapéutica, en una muestra de suero o plasma, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) incubar un anticuerpo de captura inmovilizado con una muestra de suero o plasma, que comprende el fármaco, el anticuerpo diana y el anticuerpo antifármaco, para formar un complejo anticuerpo de
10 b) lavar el complejo formado en la etapa a) con un tampón que comprende un glúcido y un detergente, que tiene un valor de pH de aproximadamente el pl de la diana,
c) incubar durante 12 a 24 horas el complejo lavado de la etapa b) con un anticuerpo marcador marcado para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador, (y)
15 d) detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco mediante la determinación del marcador detectable en el complejo formado en la etapa c).

En un modo de realización, el glúcido es sacarosa, el detergente es dodecil éter de polietilenglicol, el fármaco es un anticuerpo anti-C5, la diana es C5 humana y el tampón tiene un valor de pH de aproximadamente 5,5.

20 Un aspecto de acuerdo con la presente invención es un inmunoanálisis para detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico se puede unir específicamente a una diana terapéutica, en una muestra de suero o plasma, que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) incubar la muestra de suero o plasma a un valor de pH que es aproximadamente el valor de pl de la diana y, opcionalmente, retirar el precipitado formado después de la incubación,
30 b) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa a) a un valor de pH de aproximadamente 2 y, opcionalmente, centrifugar la muestra incubada para retirar el precipitado formado,
c) ajustar el valor de pH a aproximadamente 7,4, añadir anticuerpo de captura conjugado con un primer miembro de un par de unión y anticuerpo marcador conjugado con un marcador detectable a la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa b), e incubar la mezcla para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo
35 antifármaco-anticuerpo marcador, (y)
d) medir y/o determinar y/o cuantificar el complejo formado en la etapa c) y, de este modo, detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra de suero o plasma.

40 En un modo de realización, la etapa de medir y/o determinar y/o cuantificar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador (paso d)) comprende las etapas de

d1) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa c) con el segundo miembro del par de unión conjugado a una superficie sólida para capturar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo
45 antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie, (y)

d2) detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco mediante la determinación del marcador detectable en el complejo formado en la etapa d1).

50 En un modo de realización, el inmunoanálisis para detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico es un anticuerpo anti-C5 que se puede unir específicamente a C5 humana, en una muestra de suero o plasma, comprende las siguientes etapas:

- 55 a) incubar la muestra de suero o plasma a un valor de pH en el intervalo de 4,7 a 5,5 durante 1,5 a 2,5 horas y, opcionalmente, retirar el precipitado formado después de la incubación,
60 b) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa a) a un valor de pH de aproximadamente 2 durante aproximadamente 5 minutos y, opcionalmente, centrifugar la muestra incubada para retirar el precipitado formado,
c) ajustar el valor de pH a aproximadamente 7,4, añadir anticuerpo farmacológico de captura conjugado con biotina y anticuerpo farmacológico marcador conjugado con digoxigenina a la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa b), e incubar la mezcla para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo
65 antifármaco-anticuerpo marcador,
d) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa c) con (estrept)avidina conjugada a una superficie

ES 3 012 463 T3

sólida para capturar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie, (y)

- 5 e) detectar y/o determinar y/o cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco determinando la digoxigenina en el complejo formado en la etapa d) mediante incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante y, después de esto, incubación con HPPA o TMB, y detectando y/o determinando y/o cuantificando de este modo la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra de suero o plasma.

10 El ensayo como se informa en el presente documento aborda la interferencia de la diana de un fármaco terapéutico en la medición y/o determinación y/o cuantificación de anticuerpos antifármaco en una muestra de suero o plasma.

15 Normalmente, se debe abordar la interferencia del fármaco en la determinación y/o medición y/o cuantificación de anticuerpos antifármaco (ADA) en una muestra de suero o plasma. Por lo tanto, las medidas pueden ser una alta sensibilidad específica por el anticuerpo antifármaco, influir en el equilibrio de la muestra hacia el anticuerpo antifármaco libre, disociar los complejos ADA-fármaco mediante el pretratamiento de la muestra, detectar los complejos ADA-fármaco o enriquecer en ADA.

Pero, de este modo, no se aborda la interferencia de la diana del fármaco en la muestra.

20 El inmunoanálisis como se informa en el presente documento se ejemplifica en lo que sigue con un anticuerpo anti-C5 terapéutico. Esto se presenta simplemente como una ejemplificación del inmunoanálisis actualmente informado y no se debe interpretar como una limitación de la invención actual.

25 La C5 humana tiene una concentración sérica de aproximadamente 70 µg/ml (aproximadamente 368 nM).

30 Se evaluaron diferentes diluciones de muestra (1:100, 1:1000), diferentes concentraciones de anticuerpo de captura así como de anticuerpo marcador (500 ng/ml cada uno, 1000 ng/ml cada uno, 1500 ng/ml cada uno, 2000 ng/ml cada uno), diferentes concentraciones de peroxidasa (5 mU, 10 mU, 25 mU, 50 mU a una concentración de anticuerpo de captura y marcador de 1000 ng/ml) (véanse las figuras 1 y 2). Para todos los experimentos, se realizó una incubación de la muestra con los reactivos durante la noche.

35 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que la concentración del anticuerpo de captura y del anticuerpo marcador debe ser de al menos 500 ng/ml, con lo que, a 1500 ng/ml o más, no se podría lograr ninguna ganancia de señal adicional.

Pero está presente un fondo bastante alto.

40 En presencia de suero humano al 1 % (v/v), se pudo observar unión no específica. El bloqueo de la placa con BSA no resolvió el problema de la unión no específica.

sin BSA:

	Bi/Dig	Bi/Dig	-/-		Bi/-		-/Dig		Bi/Dig	
	valor de corte	individual	neg./pos. respecto al valor de corte del tampón							
HPS	1631	2199	66	58	78	78	417	757	4061	4070
		2198	83	83	68	72	108	126	1286	1302
		2201	54	60	58	53	74	63	644	669
		2195	59	58	53	51	98	88	3612	3763
tampón	84	2205	55	75	62	56	89	90	3591	3650
		2202	53	54	72	51	283	289	5054	5200
		2194	575	568	302	281	966	1053	7336	7444
		2196	129	178	97	119	144	159	1336	1379

con BSA:

	Bi/Dig	Bi/Dig	-/-		Bi/-		-/Dig		Bi/Dig	
	valor de corte	individual	neg./pos. respecto al valor de corte del tampón							
HPS	1690	2199	63	64	75	59	542	709	4024	3997
		2198	89	96	73	85	112	129	1294	1286
		2201	55	51	51	51	61	66	653	663
		2195	60	54	47	56	79	91	3589	3660
tampón	71	2205	51	52	52	52	77	83	3621	3621
		2202	64	54	59	60	271	265	5175	5192
		2194	640	620	318	317	1060	1060	7549	7522

ES 3 012 463 T3

		2196	152	157	100	110	152	178	1370	1380
--	--	------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------	------

Se puede observar que, incluso en ausencia de los reactivos Bi/Dig, se obtiene una señal alta (columna "-/-"). Entre otras cosas, todavía se puede observar unión no específica del reactivo de detección (columna "-/Dig").

- 5 Mediante la adición de un detergente (Brij 35), se pudo observar una reducción de la unión no específica (véanse las columnas "Bi/-" y "-/Dig"). En ausencia del detergente, el valor de corte (CP) fue 10240 (aprox. 2562 ng/ml) (véase la columna "Bi/Dig"), mientras que, en presencia del detergente, el CP fue 4708 (aprox. 817 ng/ml) (véase la columna "Bi/Dig"). Pero el coeficiente de variación (CV) de las muestras individuales es alto.

- 10 sin detergente:

	Bi/Dig	Bi/Dig	-/-				-/Dig		Bi/Dig	
	valor de corte	individual	neg./pos. respecto al valor de corte del tampón							
HPS	1471	2199	195	198	98	86	992	1113	7045	6993
		2198	167	179	66	62	185	209	1359	1388
		2201	192	157	83	86	189	181	714	749
		2195	256	184	63	63	355	393	4841	4805
tampón	216	2205	201	192	66	65	370	317	4431	4489
		2202	153	172	78	86	620	584	6959	7110
		2194	152	180	78	82	687	807	10557	10249
		2196	230	243	81	89	241	197	1410	1219

con detergente:

	Bi/Dig	Bi/Dig	-/-				-/Dig		Bi/Dig	
	valor de corte	individual	neg./pos. respecto al valor de corte del tampón							
HPS	1044	2199	66	65	65	71	160	167	3026	2975
		2198	53	53	51	56	63	75	828	862
		2201	63	55	58	54	63	66	470	489
		2195	55	54	53	55	103	100	2456	2515
tampón	144	2205	54	53	52	54	94	99	2452	2431
		2202	53	56	57	54	123	169	3498	3598
		2194	55	58	58	55	173	145	4690	4648
		2196	64	69	54	67	72	81	856	882

- 15 El intercambio del sustrato por la enzima de detección puede reducir la proporción señal-ruido (S/R) con detergente y HPPA (ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico):

	Bi/Dig	Bi/Dig	-/-				-/Dig		Bi/Dig	
	valor de corte	individual	neg./pos. respecto al valor de corte del tampón							
HPS	1044	2199	66	65	65	71	160	167	3026	2975
		2198	53	53	51	56	63	75	828	862
		2201	63	55	58	54	63	66	470	489
		2195	55	54	53	55	103	100	2456	2515
tampón	144	2205	54	53	52	54	94	99	2452	2431
		2202	53	56	57	54	123	169	3498	3598
		2194	55	58	58	55	173	145	4690	4648
		2196	64	69	54	67	72	81	856	882

- 20 con detergente y TMB (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina):

	Bi/Dig	Bi/Dig	-/-				-/Dig		Bi/Dig			
50000	2,136	2,138	0,046	0,049	0,030	0,031	0,033	0,033	0,036	0,037	0,124	0,122
17857	1,126	1,119	0,043	0,047	0,029	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,048	0,050
6378	0,546	0,538	0,046	0,049	0,032	0,031	0,030	0,030	0,033	0,033	0,042	0,041
2278	0,313	0,310	0,045	0,048	0,028	0,030	0,030	0,029	0,033	0,033	0,100	0,099
813	0,162	0,162	0,029	0,033	0,028	0,028	0,029	0,027	0,033	0,032	0,092	0,092
291	0,084	0,092	0,029	0,033	0,029	0,030	0,030	0,026	0,035	0,035	0,127	0,127
104	0,068	0,060	0,028	0,032	0,028	0,029	0,030	0,028	0,034	0,035	0,154	0,158
blanco	0,050	0,050	0,030	0,033	0,030	0,031	0,031	0,029	0,033	0,032	0,050	0,049

ES 3 012 463 T3

Cuando se usó HPPA, el valor de corte (CP) fue 4708 (aprox. 817 ng/ml), mientras que, cuando se usó TMB, el CP fue 0,162 (aprox. 845 ng/ml).

	HPPA	S/R	TMB	S/R
	blanco de mezcla		blanco de mezcla	
HPS	1389	7,8	0,044	1,9
tampón	178		0,023	

5 Para evitar una incubación prolongada (incubación durante la noche), se introdujo una etapa de disociación ácida. A continuación, el procedimiento comprende una incubación de 30 minutos a pH 2, seguida de un ajuste del pH a pH 7,4, adición del anticuerpo de captura biotinilado y el anticuerpo marcador digoxigenilado y una incubación de una hora.

10 A partir de 8 muestras individuales, se determinó un valor promedio de 4410 unidades de fluorescencia con un coeficiente de variación de un 9 %. El valor de corte fue 5059 unidades fluorescentes (1915 ng/ml). Por tanto, la introducción de la etapa de disociación ácida no dio como resultado una mejora de la sensibilidad.

15 La presencia de plasma o suero no modificó significativamente las características del ensayo. El suero humano y el de NHP proporcionan resultados de ensayo similares (véase la figura 3).

20 El suero de caballo y de conejo proporcionan resultados similares como tampón. La C5 de caballo y de conejo no presentan reactividad cruzada. La señal de blanco de suero humano empobrecido en C5 es comparable a la del tampón y las señales tras una dilución 4x son menores que con la mezcla de sueros humanos (véase la figura 4).

El rendimiento del ensayo se vio afectado por el incremento del suero de caballo y, por lo tanto, del contenido de C5 de caballo en la muestra (véase la figura 5).

25 Asimismo, una adición de C5 humana provoca un incremento de la señal, lo que confirma que la interferencia del ensayo proviene de la diana del anticuerpo terapéutico en la muestra (véase la figura 6).

30 Se ha descubierto que la calibración de un ensayo de doble captura es posible tanto con C5 como con pAb de control, es decir, la C5 está provocando señales en el ensayo (véase la figura 7). Sin estar limitado por esta teoría, se asume que los agregados pegajosos de C5 están provocando el problema (véase la figura 8 (tampón de lavado pH 7,4) y la figura 9 (tampón de lavado pH 5,5)).

35 Se ha descubierto que tanto C5 como pAb se unen al fármaco terapéutico. Una mayor proporción entre fármaco y C5 da como resultado respuestas menores, lo que indica que no hay unión no específica (véanse los datos de BIAcore en la figura 10).

40 Se ha descubierto que tanto C5 como pAb se unen al fármaco terapéutico usando una superficie prerrecubierta con el fármaco terapéutico. Después de capturar la C5, la superficie se puede unir al fármaco terapéutico, lo que sugiere que todavía hay epítopos libres presentes, lo mismo que sucede para la C5 agregada (véase la figura 11).

En base a estos hallazgos, se ha adaptado adicionalmente el procedimiento usando una etapa de lavado potenciada que consiste en lavar 6 veces con un tampón con un valor de pH de 5,5. Sin estar limitado por esta teoría, esto reduce la cantidad de agregados capturados.

45 Resultados en suero al 1 %; S/R = 7; valor de corte = 2429 FU (0,82 ng/ml)

individual	D.O. promedio	concentración
2199	2005	>blanco, <104 ng/ml
2198	1364	>blanco, <104 ng/ml
2201	374	<blanco
2195	1050	>blanco, <104 ng/ml
2205	970	>blanco, <104 ng/ml
2202	1881	>blanco, <104 ng/ml
2194	1593	>blanco, <104 ng/ml

ES 3 012 463 T3

2196	2188	>blanco, <104 ng/ml
------	------	---------------------

Resultados en suero al 0,1 %; S/R = 2; valor de corte = 2660 FU (0,84 ng/ml)

individual	D.O. promedio	concentración
2199	2670	>blanco, <104 ng/ml
2198	1822	>blanco, <104 ng/ml
2201	1187	<blanco
2195	1507	>blanco, <104 ng/ml
2205	1403	>blanco, <104 ng/ml
2202	2148	>blanco, <104 ng/ml
2194	1840	>blanco, <104 ng/ml
2196	2262	>blanco, <104 ng/ml

5 La proporción S/R disminuye con la dilución. El valor de corte y el calibrador más bajo son similares en muestras que contienen suero al 1 % y 0,1 %. El valor de corte estuvo cerca de 100 ng/ml para el control positivo en suero.

Se adaptó el ensayo a los hallazgos como se informa en el presente documento para reducir la formación de agregados mediante realización de una incubación a 4 °C durante aproximadamente 16 horas (durante la noche), mediante la adición de un 6,5 % en peso de sacarosa al tampón de ensayo y mediante la adición del detergente no iónico Brij 35.

El ensayo se adaptó además usando un tampón de lavado con un valor de pH de 5,5 para reducir la interacción entre el fármaco terapéutico y la diana, es decir, C5.

En base a los hallazgos como se explica anteriormente, se estableció un nuevo formato de ensayo en el que los agregados de C5 presentes en la muestra se retiran antes de la determinación y/o medición y/o cuantificación del anticuerpo antifármaco en una muestra.

El nuevo formato de ensayo como se informa en el presente documento comprende una etapa de precipitación específica en la que la diana del anticuerpo terapéutico precipita a un valor de pH de aproximadamente su valor de pl. En el caso de un anticuerpo anti-C5 como fármaco terapéutico, la diana es C5 humana y la precipitación se logra mediante una incubación a un valor de pH en el intervalo de 4,7 a 5,5. En un modo de realización, la incubación es a un valor de pH de aproximadamente 5. En un modo de realización preferente, la incubación es a un valor de pH de aproximadamente 5 durante aproximadamente 2 horas, opcionalmente con agitación.

El nuevo formato de ensayo como se informa en el presente documento comprende, después de la etapa de precipitación específica, una etapa de disociación ácida. En esta etapa, sin estar limitado por esta teoría, el ADA (anticuerpo anti-anticuerpo anti-C5; anticuerpo anti-fármaco) se disocia del precipitado. En un modo de realización preferente, la disociación ácida es mediante una incubación a un valor de pH de aproximadamente 2 durante aproximadamente 5 minutos.

El nuevo formato de ensayo como se informa en el presente documento comprende opcionalmente, después de la etapa de disociación ácida, una etapa de centrifugación.

El nuevo formato de ensayo como se informa en el presente documento comprende, después de la etapa de disociación ácida, la etapa de ajuste del valor de pH de la muestra a aproximadamente 7,4, seguida de la adición del anticuerpo de captura y el anticuerpo marcador con incubación posterior. En un modo de realización, el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcador son el anticuerpo farmacológico. En un modo de realización, el anticuerpo de captura se conjuga con un primer miembro de un par de unión. En un modo de realización, el par de unión se selecciona de biotina/(estrept)avidina, hapteno/anticuerpo anti-hapteno, ácido nucleico/ácido nucleico complementario y ligando/receptor de ligando. En un modo de realización preferente, el par de unión es biotina/(estrept)avidina. En un modo de realización preferente, el anticuerpo de captura se conjuga con biotina. En un modo de realización, el anticuerpo marcador se conjuga con un marcador detectable.

El nuevo formato de ensayo como se informa en el presente documento comprende, después de la etapa de incubación con el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcador, la inmovilización del complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador sobre una fase sólida derivatizada con el segundo miembro del par de unión. En un modo de realización preferente, el segundo miembro del par de unión es (estrept)avidina.

El nuevo formato de ensayo como se informa en el presente documento comprende, después de la etapa de inmovilización, la etapa de medición y/o determinación y/o cuantificación de la cantidad del complejo inmovilizado mediante incubación del complejo inmovilizado con un anticuerpo que se une específicamente al marcador detectable conjugado con una enzima que cataliza la conversión de un sustrato incoloro en un producto coloreado, seguida de incubación con el sustrato incoloro de la enzima, determinación de la cantidad de producto coloreado

ES 3 012 463 T3

5 formado y correlación de la cantidad de producto coloreado formado con una curva de calibración y, de este modo, determinación de la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra. En un modo de realización, el marcador detectable es un hapteno. En un modo de realización, el hapteno se selecciona de biotina, digoxigenina, teofilina y bromo desoxiuridina. En un modo de realización preferente, el marcador detectable es digoxigenina. En un modo de realización preferente, la enzima es peroxidasa de rábano picante. En un modo de realización, el sustrato incoloro es ABTS o HPPA o TMB. En un modo de realización preferente, el sustrato incoloro es TMB.

10 Los resultados obtenidos con un procedimiento como se informa en el presente documento (enfoque de precipitación de C5) basados en 30 muestras individuales se presentan en las siguientes tablas.

datos de la curva de calibración:

concentración [ng/ml]	promedio [FU]	Desv. est. [FU]	CV [%]	calculado [ng/ml]	recuperación [%]
50000	41337	146	0,4	50054	100
17857	18883	151	0,8	19421	109
6378	7290	33	0,4	6107	96
2278	3010	91	3,0	2050	90
813	1475	16	1,1	827	102
291	774	9	1,2	347	119
104	340	4	1,2	96	93
mezcla	118	6	5,4		

15 señales FU de las 30 muestras individuales:

102	103	116	132
133	98	96	97
105	100	99	113
112	112	101	102
114	122	115	109
116	123	130	112
136	131	133	116
	123		133

promedio	114
Desv. est.	12,7
CV	11 %
CP	135

20 El nuevo ensayo que se informa en el presente documento tiene un intervalo dinámico adecuado a alto, es sensible y aborda la interferencia de los niveles diana individuales presentes en la muestra que se va a analizar.

Para el procesamiento de la muestra, antes del análisis no es necesario retirar el precipitado formado en la etapa de incubación a aproximadamente el pl de la diana. Sin la etapa de incubación ácida, la interferencia está presente (véase la figura 12):

A: con centrifugación después de etapa de tratamiento ácido (figura 12, 2)	
promedio	114
Desv. est.	7,9
CV	7 %
CP [FU]	127
CP [ng/ml]	12
B: sin centrifugación después de etapa de tratamiento ácido (figura 12, 1)	
promedio	98
Desv. est.	9,3
CV	9 %
CP [FU]	113
CP [ng/ml]	17
C: sin etapa de incubación ácida (figura 12, 3)	
promedio	3290
Desv. est.	4353

CV	132 %
CP [FU]	10428
CP [ng/ml]	2084

La calibración con control positivo, tiempo de incubación prolongado y lavado a pH 5,5 se muestra en la figura 13. El promedio de 15 muestras individuales es 119, el valor de la mezcla de blancos es 123 y el valor de corte es 135.

5 La calibración con anticuerpo policlonal, tiempo de incubación prolongado y lavado a pH 7,4 se muestra en la figura 14. El promedio de 15 muestras individuales es 145, el valor de la mezcla de blancos es 157 y el valor de corte es 193.

10 La calibración con anticuerpo policlonal, tiempo de incubación corto y lavado a pH 5,5 se muestra en la figura 15. El promedio de 15 muestras individuales es 124, el valor de la mezcla de blancos es 115 y el valor de corte es 247.

La calibración con anticuerpo policlonal en presencia de C5, incubación de 2 horas a pH 5 y lavado a pH 5,5 se muestra en la figura 16.

15 La calibración con anticuerpo policlonal en presencia de C5, incubación de 2 horas a pH 5 y lavado a pH 7,5 se muestra en la figura 17.

20 La calibración con anticuerpo policlonal en presencia de C5, incubación de 30 minutos a pH 2 y lavado a pH 5,5 se muestra en la figura 18 (ensayo de ADA usando disociación ácida de acuerdo con la técnica).

Anticuerpo farmacológico ejemplar para modos de realización específicos de la invención

25 El documento US 2016/0167054 divulga anticuerpos anti-C5 y procedimientos de uso de los mismos. En algunos modos de realización, un anticuerpo anti-C5 aislado divulgado se une a un epítipo dentro de la cadena beta de C5 con mayor afinidad a pH neutro que a pH ácido.

30 C5 es una proteína de 181 kDa que se encuentra en el suero normal a aproximadamente 71 µg/ml (0,4 µM). C5 está glucosilada, con aproximadamente un 1,5-3 % de su masa atribuida al carbohidrato. La C5 madura es un heterodímero de una cadena alfa de 106 kDa que está unida por disulfuro a una cadena beta de 66 kDa. C5 se sintetiza como una proteína precursora monocatenaria (precursor pro-C5) de 1577 aminoácidos (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.355.245 y US 7.432.356). El precursor pro-C5 se escinde para proporcionar la cadena beta como un fragmento aminoterminal y la cadena a como un fragmento carboxiterminal alfa. Los fragmentos polipeptídicos de la cadena alfa y la cadena beta se conectan entre sí por medio de un enlace disulfuro y constituyen la proteína C5 madura.

35 La C5 madura se escinde en los fragmentos C5a y C5b durante la activación de las vías del complemento. C5a se escinde de la cadena alfa de C5 por la C5 convertasa como un fragmento aminoterminal que comprende los primeros 65 aminoácidos de la cadena alfa. La porción restante de la C5 madura es el fragmento C5b, que contiene el resto de la cadena alfa unida por disulfuro a la cadena beta. Aproximadamente un 20 % de la masa de 11 kDa de C5a se atribuye al carbohidrato.

40 C5a es una anafilatoxina. C5b se combina con C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque a la membrana (MAC, C5b-9, complejo de complemento terminal (TCC)) en la superficie de la célula diana. Cuando se inserta un número suficiente de MAC en las membranas de las células diana, se forman poros de MAC para mediar la lisis osmótica rápida de las células diana.

45 Las anafilatoxinas pueden desencadenar la desgranulación de los mastocitos, que libera histamina y otros mediadores de la inflamación, dando como resultado la contracción del músculo liso, una permeabilidad vascular incrementada, activación de leucocitos y otros fenómenos inflamatorios, incluyendo la proliferación celular que da como resultado la hiperplasia. C5a también funciona como un péptido quimiotáctico que sirve para atraer granulocitos tales como neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos al sitio de activación del complemento.

50 La actividad de C5a se regula por la enzima plasmática carboxipeptidasa N que retira la arginina carboxiterminal de C5a formando el derivado C5a-des-Arg. C5a-des-Arg presenta solo un 1 % de la actividad anafiláctica y la actividad quimiotáctica polimorfonuclear del C5a no modificado.

55 Si bien un sistema del complemento que funciona apropiadamente proporciona una defensa sólida contra los microbios infecciosos, la regulación o activación inadecuada del complemento se ha implicado en la patogenia de una variedad de trastornos, incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), nefritis lúpica, lesión por isquemia-reperusión, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa), enfermedad por depósitos densos (EDD), degeneración macular (por ejemplo, degeneración macular senil (DMS)), síndrome de hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas (HELLP), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), muerte fetal espontánea, vasculitis pauciinmunitaria, epidermolísis ampollosa, muerte fetal

recurrente, esclerosis múltiple (EM), lesión cerebral traumática; y lesiones resultantes de infarto de miocardio, circulación extracorporeal y hemodiálisis (véase, por ejemplo, Holers *et al.*, Immunol. Rev. 223 (2008) 300-316). Por lo tanto, la inhibición de activaciones excesivas o no controladas de la cascada del complemento puede proporcionar beneficios clínicos a los pacientes con dichos trastornos, especialmente a los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

Eculizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la proteína del complemento C5 y el primer tratamiento aprobado para el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y el síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) (véase, por ejemplo, Dmytrijuk *et al.*, The Oncologist 13 (2008) 894-910). Eculizumab inhibe la escisión de C5 en C5a y C5b por la C5 convertasa, lo que evita la generación del complejo de complemento terminal C5b-9. Tanto C5a como C5b-9 provocan los acontecimientos mediados por el complemento terminal que son característicos de la HPN y el SHUa (véanse también los documentos WO 2005/065607, WO 2007/96586, WO 2008/060790 y WO 2010/054403). Varios informes han descrito otros anticuerpos anti-C5. Por ejemplo, el documento WO 86/28707 describió un anticuerpo anti-C5 que se une a la cadena alfa de C5, pero no se une a C5a, y bloquea la activación de C5, mientras que el documento WO 2002/30886 describió un anticuerpo monoclonal anti-C5 que inhibe la formación de C5a. Por otra parte, el documento WO 2004/006653 describió un anticuerpo anti-C5 que reconoce el sitio proteolítico de la C5 convertasa en la cadena alfa de C5 e inhibe la conversión de C5 en C5a y C5b. El documento WO 2010/015608 describió un anticuerpo anti-C5 que tiene una constante de afinidad de al menos 1×10^7 M⁻¹. En un modo de realización, el fármaco es Eculizumab.

En algunos modos de realización, el procedimiento es para la detección de un ADA contra un anticuerpo anti-C5 que se une a un epítipo dentro de la cadena beta de C5. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-C5 se une a un epítipo dentro del dominio MG1-MG2 de la cadena beta de C5. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-C5 se une a un epítipo dentro de un fragmento que consiste en los aminoácidos 27-115 de la cadena beta (SEQ ID NO: 31) de C5. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-C5 se une a un epítipo dentro de la cadena beta (SEQ ID NO: 31) de C5 que comprende al menos un fragmento seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 38-48, 61-67 y 98-101. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-C5 se une a un epítipo dentro de un fragmento de la cadena beta (SEQ ID NO: 31) de C5 que comprende al menos un residuo aminoacídico seleccionado del grupo que consiste en Glu48, Asp51, His61, His63, Lys100 e His101 de SEQ ID NO: 31. En otros modos de realización, el anticuerpo se une a C5 con mayor afinidad a pH neutro que a pH ácido. En otros modos de realización, el anticuerpo se une a C5 con mayor afinidad a pH 7,4 que a pH 5,8. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-C5 se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la tabla 1. En otros modos de realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la tabla 1 con mayor afinidad a pH 7,4 que a pH 5,8. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-C5 se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito en las tablas 2 o 3. En otros modos de realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito en las tablas 2 o 3 con mayor afinidad a pH 7,4 que a pH 5,8.

Tabla 1

SEQ ID NO:								
anticuerpo	VH	VL	HVR-H 1	HVR-H 2	HVR-H 3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
CFA0305	1	11	36	46	56	66	76	86
CFA0307	2	12	37	47	57	67	77	87
CFA0357	3	13	38	48	58	68	78	88
CFA0501	4	14	39	49	59	69	79	89
CFA0538	5	15	40	50	60	70	80	90
CFA0590	6	16	41	51	61	71	81	91
CFA0567	7	17	42	52	62	72	82	92
CFA0573	8	18	43	53	63	73	83	93
CFA0576	9	19	44	54	64	74	84	94

Tabla 2

SEQ ID NO:				
anticuerpo	VH	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
305L05	10	45	55	65
305L015	97	108	109	112
305L016	98	108	110	112
305L018	99	108	109	112
305L019	100	108	109	112
305L020	100	108	109	112
305L022	100	108	109	112
305L023	101	108	111	112

Tabla 3

SEQ ID NO:				
anticuerpo	VL	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
305L05	20	75	85	95
305L015	102	113	114	116
305L016	102	113	114	116
305L018	102	113	114	116
305L019	102	113	114	116
305L020	103	113	114	116
305L022	104	113	115	116
305L023	104	113	115	116

5 En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-C5 compite por la unión a C5 con un anticuerpo que comprende un par VH y VL seleccionado de: (a) un VH de SEQ ID NO: 01 y un VL de SEQ ID NO: 11; (b) un VH de SEQ ID NO: 05 y un VL de SEQ ID NO: 15; (c) un VH de SEQ ID NO: 04 y un VL de SEQ ID NO: 14; (d) un VH de SEQ ID NO: 06 y un VL de SEQ ID NO: 16; (e) un VH de SEQ ID NO: 02 y un VL de SEQ ID NO: 12; (f) un VH de SEQ ID NO: 03 y un VL de SEQ ID NO: 13; (g) un VH de SEQ ID NO: 09 y un VL de SEQ ID NO: 19; (h) un VH de SEQ ID NO: 07 y un VL de SEQ ID NO: 17; (i) un VH de SEQ ID NO: 08 y un VL de SEQ ID NO: 18; y (j) un VH de SEQ ID NO: 10 y un VL de SEQ ID NO: 20.

15 En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-C5 es para su uso como un medicamento. En un modo de realización, el anticuerpo anti-C5 se usa para tratar una enfermedad o afección mediada por el complemento que implica una activación excesiva o descontrolada de C5. En modos de realización adicionales, el anticuerpo anti-C5 se usa para tratar enfermedades o trastornos que incluyen, pero no se limitan a, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), degeneración macular senil, infarto de miocardio, artritis reumatoide, osteoporosis, artrosis e inflamación. El anticuerpo anti-C5 se usa para potenciar la eliminación de C5 del plasma.

20 En determinados modos de realización, el procedimiento es para la detección de ADA contra un anticuerpo anti-C5 que comprende un VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente y una región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 27, 28, 29, 105, 106 y 107. En determinados modos de realización, el procedimiento es para la detección de un anticuerpo anti-C5 que comprende un VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente y una región constante de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38.

30 En determinados modos de realización, el procedimiento es para la detección de ADA contra un anticuerpo anti-C5 que compite por la unión a C5 con un anticuerpo que comprende un par VH y VL seleccionado de: (a) un VH de SEQ ID NO: 01 y un VL de SEQ ID NO: 11; (b) un VH de SEQ ID NO: 22 y un VL de SEQ ID NO: 25; (c) un VH de SEQ ID NO: 21 y un VL de SEQ ID NO: 24; (d) un VH de SEQ ID NO: 05 y un VL de SEQ ID NO: 15; (e) un VH de SEQ ID NO: 04 y un VL de SEQ ID NO: 14; (f) un VH de SEQ ID NO: 06 y un VL de SEQ ID NO: 16; (g) un VH de SEQ ID NO: 02 y un VL de SEQ ID NO: 12; (h) un VH de SEQ ID NO: 03 y un VL de SEQ ID NO: 13; (i) un VH de SEQ ID NO: 09 y un VL de SEQ ID NO: 19; (j) un VH de SEQ ID NO: 7 y un VL de SEQ ID NO: 17; (k) un VH de SEQ ID NO: 8 y un VL de SEQ ID NO: 18; (l) un VH de SEQ ID NO: 23 y un VL de SEQ ID NO: 26; y (m) un VH de SEQ ID NO: 10 y un VL de SEQ ID NO: 20.

40 En determinados modos de realización, el procedimiento es para la detección de ADA contra un anticuerpo anti-C5 que compite por la unión a C5 con un anticuerpo que comprende un par VH y VL seleccionado de: (a) un VH de SEQ ID NO: 22 y un VL de SEQ ID NO: 25; (b) un VH de SEQ ID NO: 21 y un VL de SEQ ID NO: 24; (c) un VH de SEQ ID NO: 05 y un VL de SEQ ID NO: 15; (d) un VH de SEQ ID NO: 04 y un VL de SEQ ID NO: 14; (e) un VH de SEQ ID NO: 06 y un VL de SEQ ID NO: 16; (f) un VH de SEQ ID NO: 02 y un VL de SEQ ID NO: 12; (g) un VH de SEQ ID NO: 03 y un VL de SEQ ID NO: 13; (h) un VH de SEQ ID NO: 09 y un VL de SEQ ID NO: 19; (i) un VH de SEQ ID NO: 07 y un VL de SEQ ID NO: 17; (j) un VH de SEQ ID NO: 8 y un VL de SEQ ID NO: 18; (k) un VH de SEQ ID NO: 23 y un VL de SEQ ID NO: 26.

45 Se proporcionan los siguientes ejemplos, secuencias y figuras para contribuir al entendimiento de la presente invención, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas.

50 **Descripción de las figuras**

Figura 1: Efecto de diferentes concentración de anticuerpo de captura, así como de anticuerpo marcador ((1): 500 ng/ml cada uno, (2): 1000 ng/ml cada uno, (3): 1500 ng/ml cada uno, (4): 2000 ng/ml cada uno).

55 **Figura 2:** Efecto de diferentes concentraciones de peroxidasa ((1): 5 mU, (2): 10 mU, (3): 25 mU, (4): 50 mU)

a una concentración de anticuerpo de captura y marcador de 1000 ng/ml).

- 5 **Figura 3:** Efecto del suero humano y de NHP ((1): suero humano, (2): plasma humano, (3): suero de macaco cangrejero).
- Figura 4:** Efecto de plasma de caballo (1), de conejo (2), humano empobrecido en C5 (3) y de tampón (4).
- 10 **Figura 5:** El rendimiento del ensayo se vio afectado por el incremento del suero de caballo y, por lo tanto, del contenido de C5 de caballo en la muestra (véase la figura 5) (suero humano al 1 % en suero de caballo al 0 % (1), 1 % (2), 5 % (3) o 10 % (4)).
- Figura 6:** Efecto de C5 humana en el ensayo (pAb + (1): suero humano, (2): tampón+Brij, (3): 500 ng/ml de C5 en suero humano, (4): 500 ng/ml de C5 en tampón+Brij).
- 15 **Figura 7:** Calibración de un ensayo de doble captura con C5 ((1): pH 7,4, (2): pH 5,5, (3): pH 8,0) y pAb de control (anticuerpo anti-idiotípico) ((4): pH 7,4, (5): pH 5,5, (6): pH 8,0).
- Figura 8:** Uso de tampón de lavado a pH 7,4 en el ensayo de doble captura (calibración con (1) anticuerpo anti-idiotípico pAb y anticuerpo de captura y marcador, (2) C5 sin anticuerpo de captura y sin anticuerpo marcador, (3) C5 con anticuerpo de captura y sin anticuerpo marcador, (4) C5 sin anticuerpo de captura pero con anticuerpo marcador, (5) C5 con anticuerpo de captura y anticuerpo marcador).
- 20 **Figura 9:** Uso de tampón de lavado a pH 5,5 en el ensayo de doble captura (calibración con (1) anticuerpo anti-idiotípico pAb y anticuerpo de captura y marcador, (2) C5 sin anticuerpo de captura y sin anticuerpo marcador, (3) C5 con anticuerpo de captura y sin anticuerpo marcador, (4) C5 sin anticuerpo de captura pero con anticuerpo marcador, (5) C5 con anticuerpo de captura y anticuerpo marcador).
- 25 **Figura 10:** Efecto de la proporción fármaco-C5; sensograma de SPR ajustado; (1): C5, (2): C5+pAb 100/100 nM, (3): C5+pAb 100/10 nM, (4): C5+pAb 100/250 nM, (5): C5+pAb 100/500 nM, (6): C5+pAb 100/50 nM, (7): mAb-C5, (8): pAb-mAb anti-idiotípico C5, (9) tampón.
- Figura 11:** Unión de pAb (verde) y C5 (rojo) a una superficie recubierta con fármaco biotinilado, seguida de adición de tampón o marcador (1, 2)/fármaco digoxigenilado (3, 4) en el momento indicado por la flecha.
- 35 **Figura 12:** Calibración de pAb en el ensayo de doble captura (1) sin centrifugación (2) con centrifugación en comparación con una calibración sin aplicar la etapa de incubación ácida (3).
- 40 **Figura 13:** Calibración con control positivo, tiempo de incubación prolongado y lavado a pH 5,5.
- Figura 14:** Calibración con anticuerpo policlonal, tiempo de incubación prolongado y lavado a pH 7,4.
- 45 **Figura 15:** Calibración con anticuerpo policlonal, tiempo de incubación corto y lavado a pH 5,5 confidencial.
- Figura 16:** Calibración con anticuerpo policlonal en presencia de suero (1), tampón (2), incubación de 2 horas a pH 5 y lavado a pH 5,5, calibración con C5 en presencia de suero (3), tampón (4), incubación de 2 horas a pH 5 y lavado a pH 5,5.
- 50 **Figura 17:** Calibración con anticuerpo policlonal en presencia de suero (1), tampón (2), incubación de 2 horas a pH 5 y lavado a pH 7,4, calibración con C5 en presencia de suero (3), tampón (4), incubación de 2 horas a pH 5 y lavado a pH 7,4.
- 55 **Figura 18:** Calibración con anticuerpo policlonal en presencia de suero (1), tampón (2), incubación de 0,5 horas a pH 2 y lavado a pH 5,5, calibración con C5 en presencia de suero (3), tampón (4), incubación de 0,5 horas a pH 2 y lavado a pH 5,5.

Ejemplos

60

Ejemplo 1

Ensayo con sacarosa y Brij

65 Se incubó el fármaco biotinilado y digoxigenilado con 30 muestras de suero individuales. Para someter a prueba funcionalmente los reactivos usados (control), se prepararon muestras de suero (mezcla de suero) con diferentes

concentraciones de un estándar de control positivo artificial, se incubaron y procesaron como muestras de suero individuales. Las concentraciones del fármaco marcado se mantuvieron constantes a 1000 ng/ml cada una. La concentración sérica final en el ensayo fue de un 1 %. Se transfirieron los inmunocomplejos formados a una placa de microvaloración recubierta de estreptavidina (SA) blanca y se incubaron durante 1 hora para inmovilizar los complejos por medio del reactivo de captura marcado con biotina. Después de la aspiración del sobrenadante, se retiraron las sustancias no unidas mediante lavados repetidos. Se incubaron los complejos inmovilizados con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-digoxigenina-POD (poli)). Se realizó cada etapa con el mismo tampón usando un tampón PBS con sacarosa al 6,5 % o bien un tampón universal Roche para ELISA con Brij 35 a una concentración de un 0,5 %. Finalmente, se visualizaron los inmunocomplejos inmovilizados formados mediante adición de solución de HPPA oxidada, un sustrato POD fluorescente. Se determinó la emisión fotométricamente (excitación a 320 nm, emisión a 405 nm de longitud de onda) y se ajustó en relación con la concentración del control positivo en la muestra. Los CV de las muestras de suero individuales son un 29 % (ensayo de tampón sacarosa) y un 181 % (tampón universal Roche con Brij).

Ejemplo 2

Ensayo con etapa de incubación ácida

Se incubaron las muestras de suero individuales (N = 30) y las muestras de control positivo artificial durante 2 horas con un tampón de acetato 10 mM, pH 5,0. Después de esto, se incubaron las muestras durante 5 min con clorhidrato de glicina 0,1 M, pH 2,0. Se mezclaron las muestras acidificadas con anticuerpo de captura biotilado y anticuerpo de detección digoxigenilado, se neutralizaron con tampón TRIS 0,5 M pH 8,5 y se incubaron durante 30 min a TA y 450 rpm en un agitador de placas de microvaloración. La concentración sérica final del ensayo fue de un 1 %. Se transfirieron los inmunocomplejos formados a una placa de microvaloración recubierta de estreptavidina (SA) y se incubaron durante 1 hora para inmovilizar los inmunocomplejos por medio del anticuerpo de captura marcado con biotina. Después de la aspiración del sobrenadante, se retiraron las sustancias no unidas mediante lavados repetidos. Se incubaron los complejos inmovilizados con un fragmento Fab anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-Dig-POD). Se visualizaron los inmunocomplejos inmovilizados formados mediante adición de solución de HPPA oxidada, un sustrato POD fluorescente. Se determinó la emisión fotométricamente (excitación a 320 nm, emisión a 405 nm de longitud de onda) y se ajustó en relación con la concentración del control positivo artificial en la muestra de suero. El control positivo artificial proporciona una proporción blanco/ruido a 100 ng/ml en suero 100 % de >3. El CV de las muestras de suero individuales (N = 30) es de un 7 %.

Ejemplo 3

Ensayo con bajo contenido de suero y sin disociación ácida

Se incubó el fármaco biotilado y digoxigenilado con 32 sueros individuales a una concentración sérica final de un 1 % y un 0,1 %. Para someter a prueba funcionalmente los reactivos usados (control), se prepararon muestras de suero (mezcla de suero) con diferentes concentraciones de un estándar de control positivo artificial, se incubaron y procesaron como muestras de suero individuales. Las concentraciones del fármaco marcado se mantuvieron constantes a 1000 ng/ml cada una. Se transfirieron los inmunocomplejos formados a una placa de microvaloración recubierta de estreptavidina (SA) blanca y se incubaron durante 1 hora para inmovilizar los complejos por medio del reactivo de captura marcado con biotina. Después de la aspiración del sobrenadante, se retiraron las sustancias no unidas mediante lavados repetidos. Se incubaron los complejos inmovilizados con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-digoxigenina-POD (poli)). Finalmente, se visualizaron los inmunocomplejos inmovilizados formados mediante adición de solución de HPPA oxidada, un sustrato POD fluorescente. Se determinó la emisión fotométricamente (excitación a 320 nm, emisión a 405 nm de longitud de onda) y fue proporcional a la concentración del control positivo en la muestra. El control positivo artificial indica una sensibilidad del ensayo de ~100 ng/ml en suero al 100 % para el ensayo a un 1 y un 0,1 %. El CV de las muestras de suero individuales es de un 74 % (ensayo de suero al 0,1 %) y de un 65 % (ensayo de suero al 1 %).

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoanálisis para cuantificar la cantidad de anticuerpo anti-anticuerpo anti-C5, en el que el anticuerpo anti-anticuerpo anti-C5 se puede unir específicamente a un anticuerpo anti-C5, en el que el anticuerpo anti-C5 que se puede unir específicamente a C5 humana, en una muestra de suero o plasma con interferencia de C5 humana reducida que comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) incubar la muestra de suero o plasma a un valor de pH que está en el intervalo de pH 4,7 a pH 5,5 y, opcionalmente, retirar el precipitado formado después de la incubación,
- 10
- b) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa a) a un valor de pH de aproximadamente 2 y, opcionalmente, centrifugar la muestra incubada para retirar el precipitado formado,
- 15
- c) ajustar el valor de pH a aproximadamente 7,4, añadir anticuerpo de captura conjugado con un primer miembro de un par de unión y anticuerpo marcador conjugado con un marcador detectable a la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa b), e incubar la mezcla para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador,
- 20
- d) cuantificar el complejo formado en la etapa c) y, de este modo, cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco en la muestra de suero o plasma.
2. El inmunoanálisis de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de cuantificar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador (etapa d)) comprende las etapas de
- 25
- d1) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa c) con el segundo miembro del par de unión conjugado a una superficie sólida para capturar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie,
- 30
- d2) cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco mediante la determinación del marcador detectable en el complejo formado en la etapa d1).
3. El inmunoanálisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el valor de pH en la etapa a) es de aproximadamente pH 5,0 o de aproximadamente pH 5,5.
- 35
4. El inmunoanálisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la incubación en la etapa a) es durante 1,5 a 2,5 horas.
5. El inmunoanálisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la incubación en la etapa b) es durante aproximadamente 5 min.
- 40
6. El inmunoanálisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la incubación en la etapa d) es durante aproximadamente 60 min.
7. El inmunoanálisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo marcador y el anticuerpo de captura son el anticuerpo anti-C5.
- 45
8. El inmunoanálisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el inmunoanálisis para cuantificar la cantidad de anticuerpo antifármaco, en el que el anticuerpo antifármaco se puede unir específicamente a un anticuerpo farmacológico, en el que el anticuerpo farmacológico es un anticuerpo anti-C5 que se puede unir específicamente a C5 humana, en una muestra de suero o plasma, comprende las siguientes etapas:
- 50
- a) incubar la muestra de suero o plasma a un valor de pH en el intervalo de 4,7 a 5,5 durante 1,5 a 2,5 horas y, opcionalmente, retirar el precipitado formado después de la incubación,
- 55
- b) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa a) a un valor de pH de aproximadamente 2 durante aproximadamente 5 minutos y, opcionalmente, centrifugar la muestra incubada para retirar el precipitado formado,
- 60
- c) ajustar el valor de pH a aproximadamente 7,4, añadir anticuerpo farmacológico de captura conjugado con biotina y anticuerpo farmacológico marcador conjugado con digoxigenina a la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa b), e incubar la mezcla para formar un complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador,
- 65
- d) incubar la muestra de suero o plasma obtenida en la etapa c) con (estrept)avidina conjugada a una superficie sólida para capturar el complejo anticuerpo de captura-anticuerpo antifármaco-anticuerpo marcador y, opcionalmente, lavar la superficie,

e) detectar el anticuerpo antifármaco determinando la digoxigenina en el complejo formado en la etapa d) mediante incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante y, después de esto, incubación con HPPA o TMB, y detectar, de este modo, el anticuerpo antifármaco en la muestra de suero o plasma (correlacionando el complejo formado con la cantidad de ADA en la muestra).

5

Figura 1

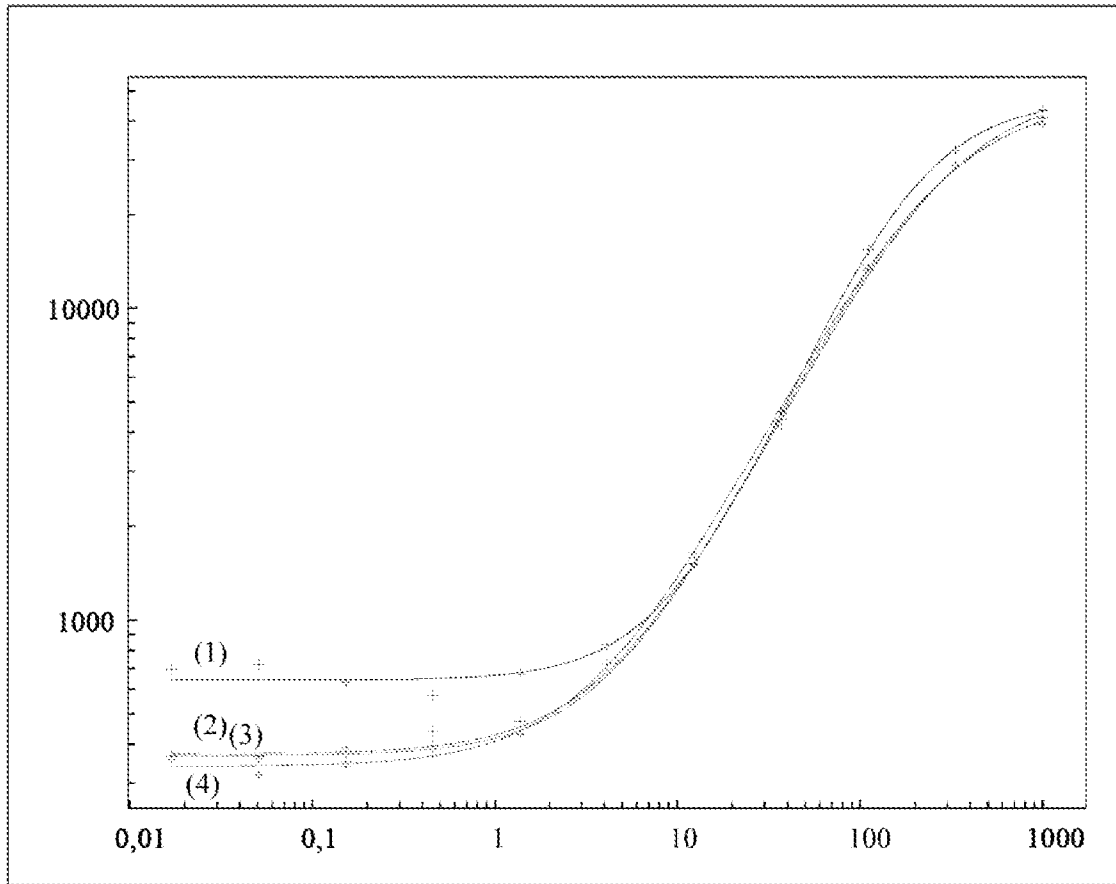


Figura 2

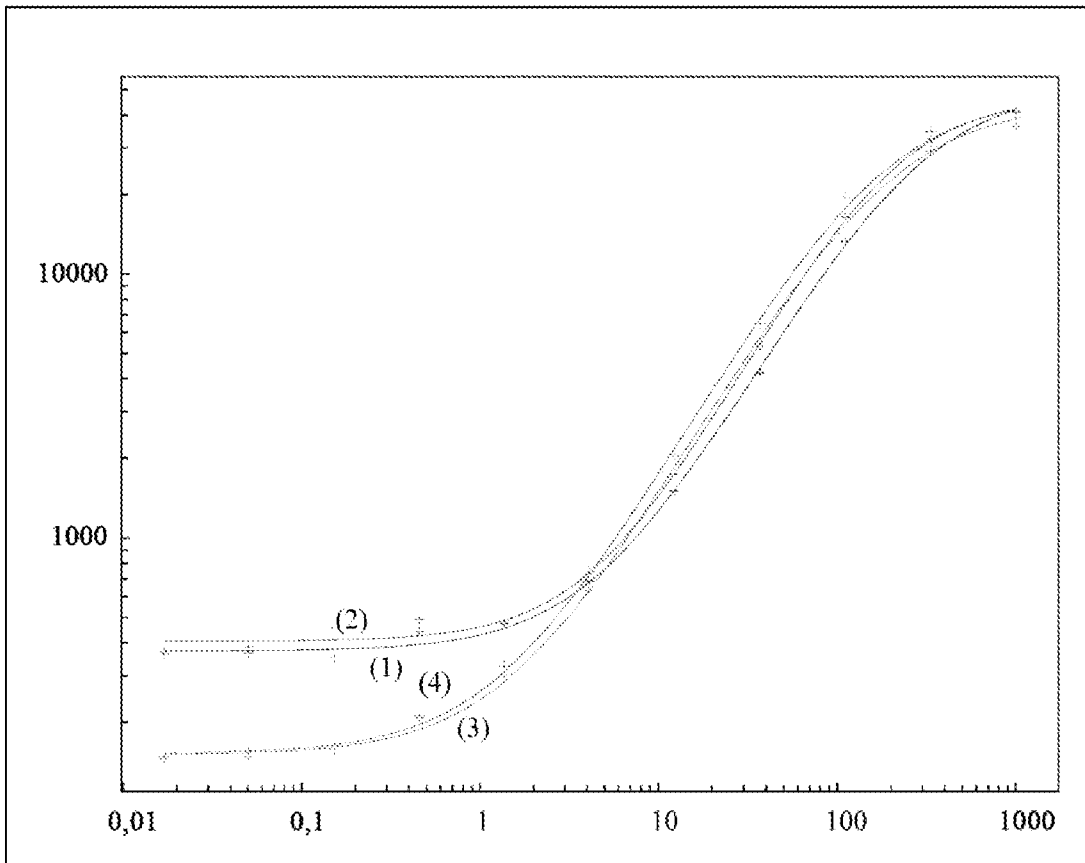


Figura 3

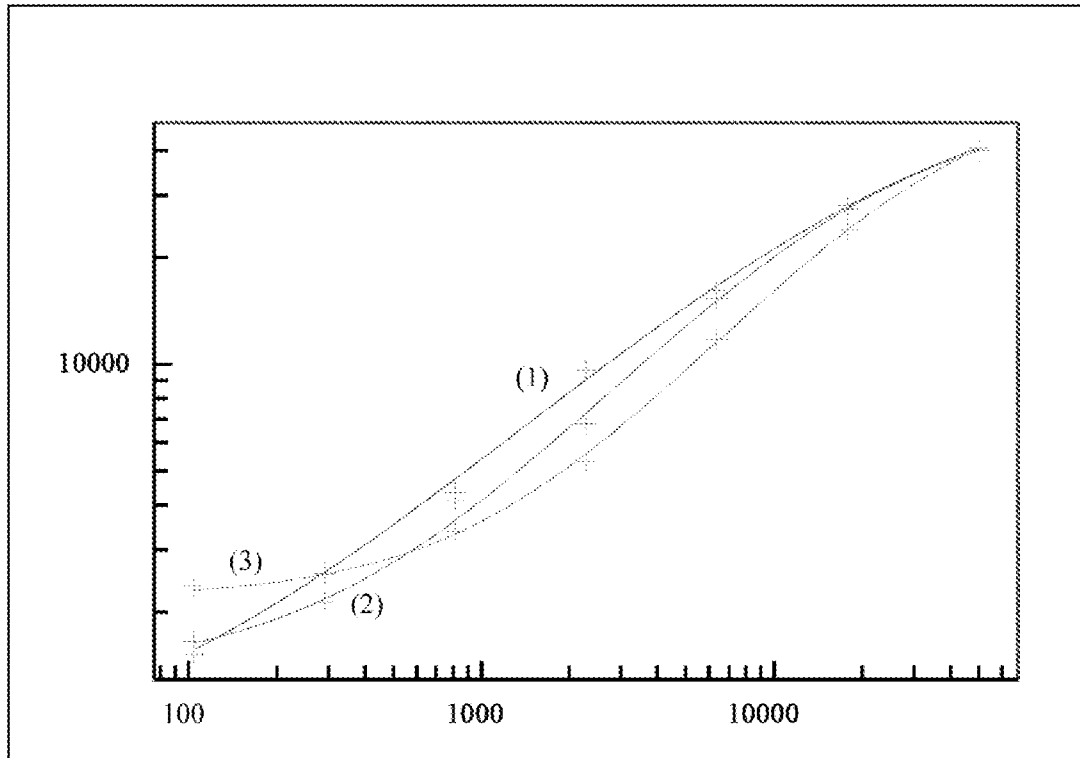


Figura 4

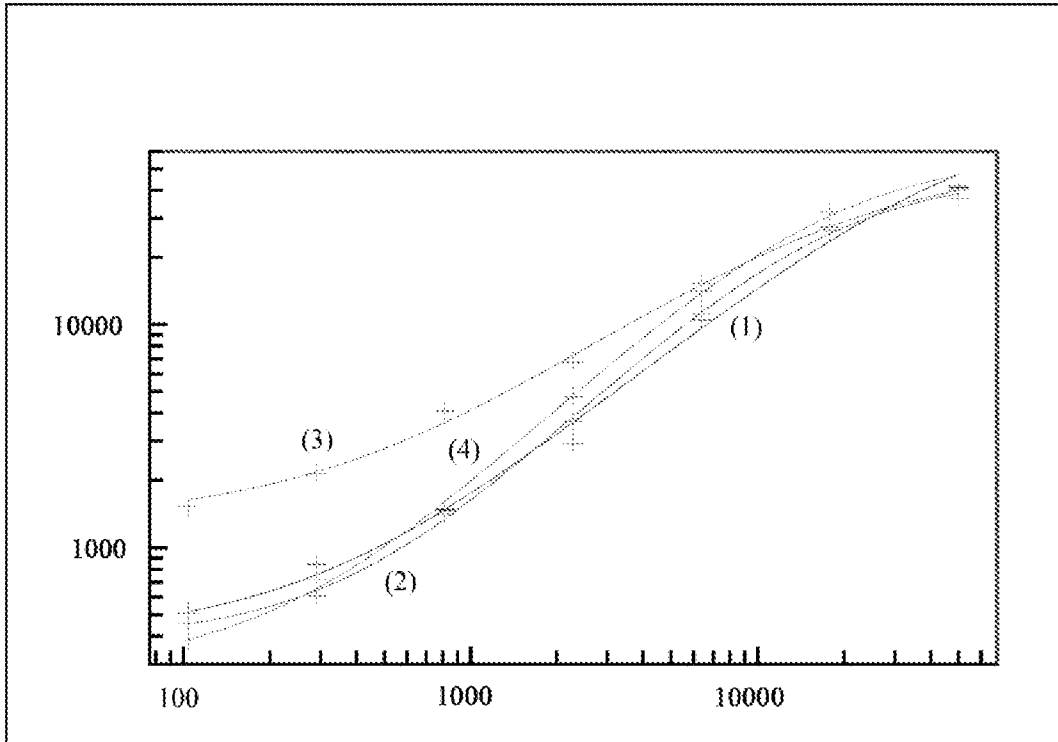


Figura 5

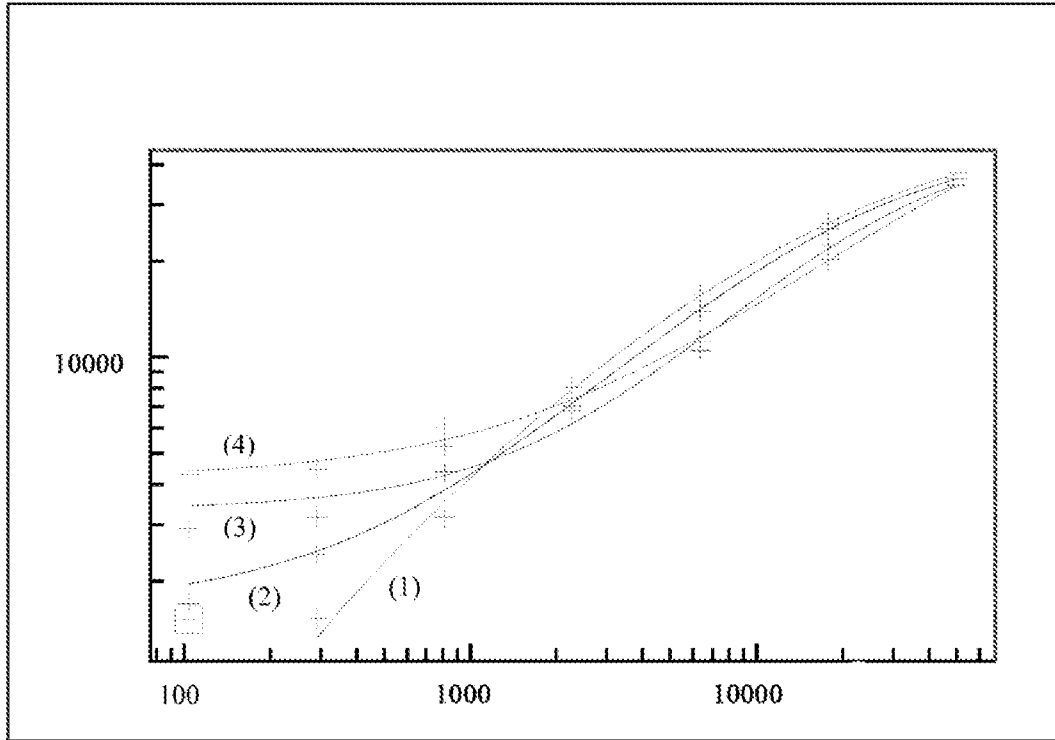


Figura 6

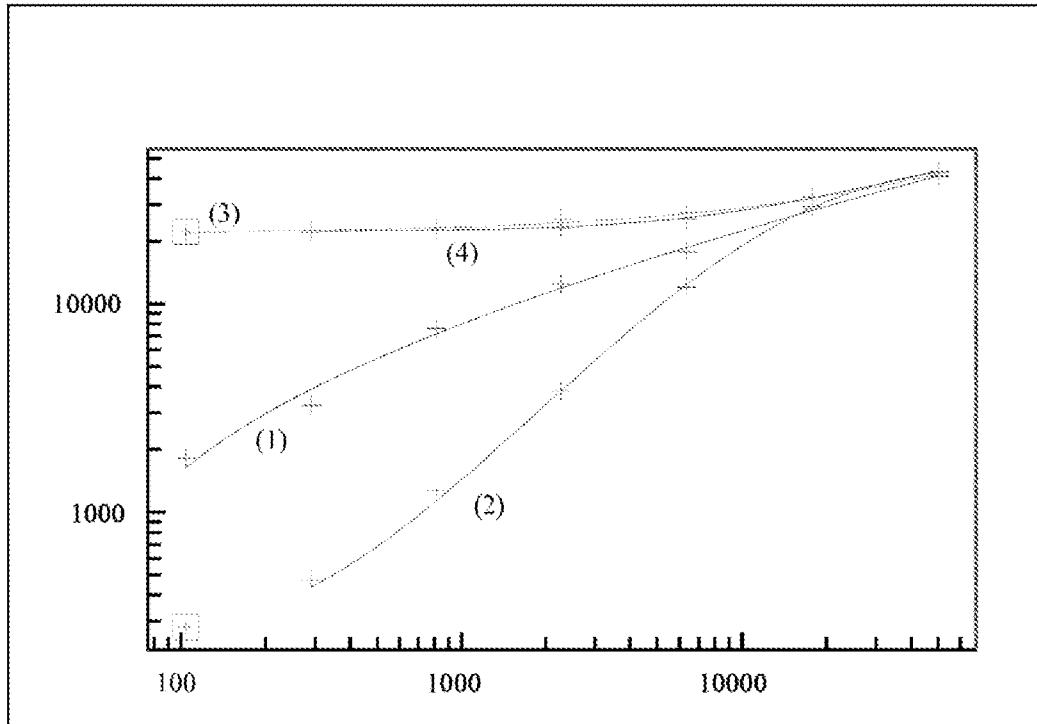


Figura 7

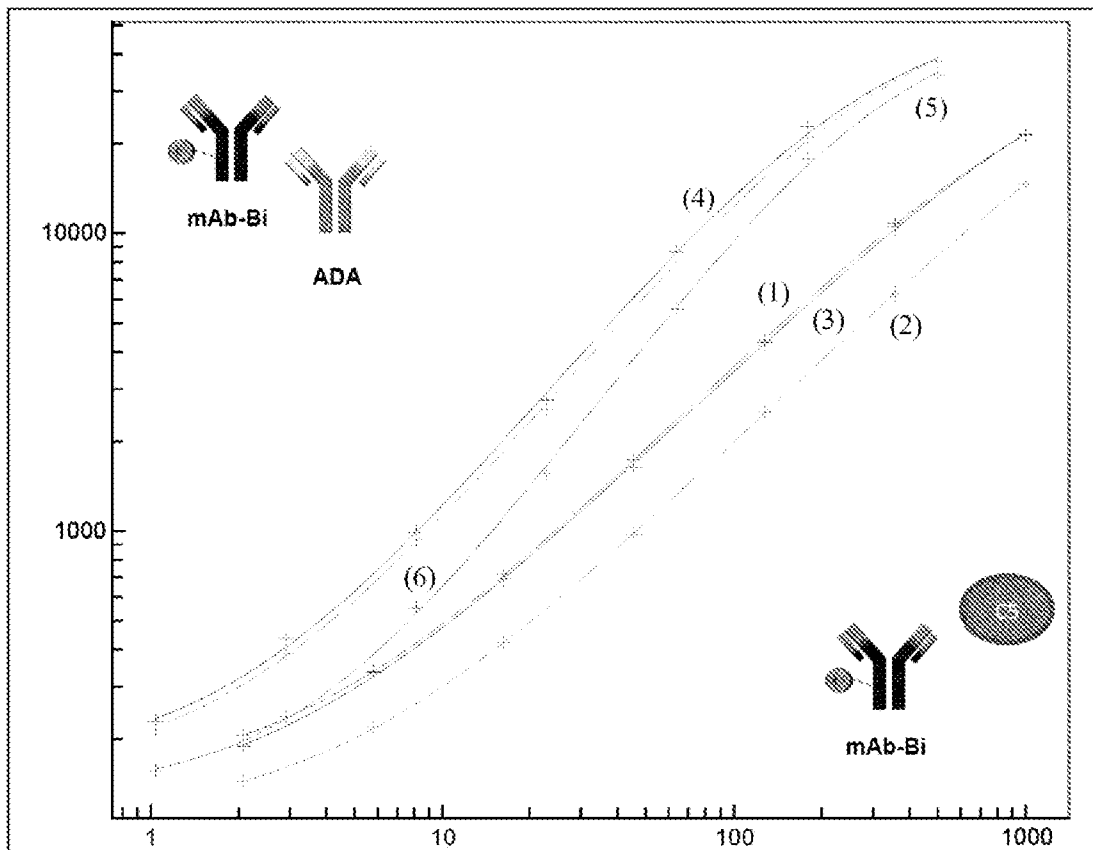


Figura 8

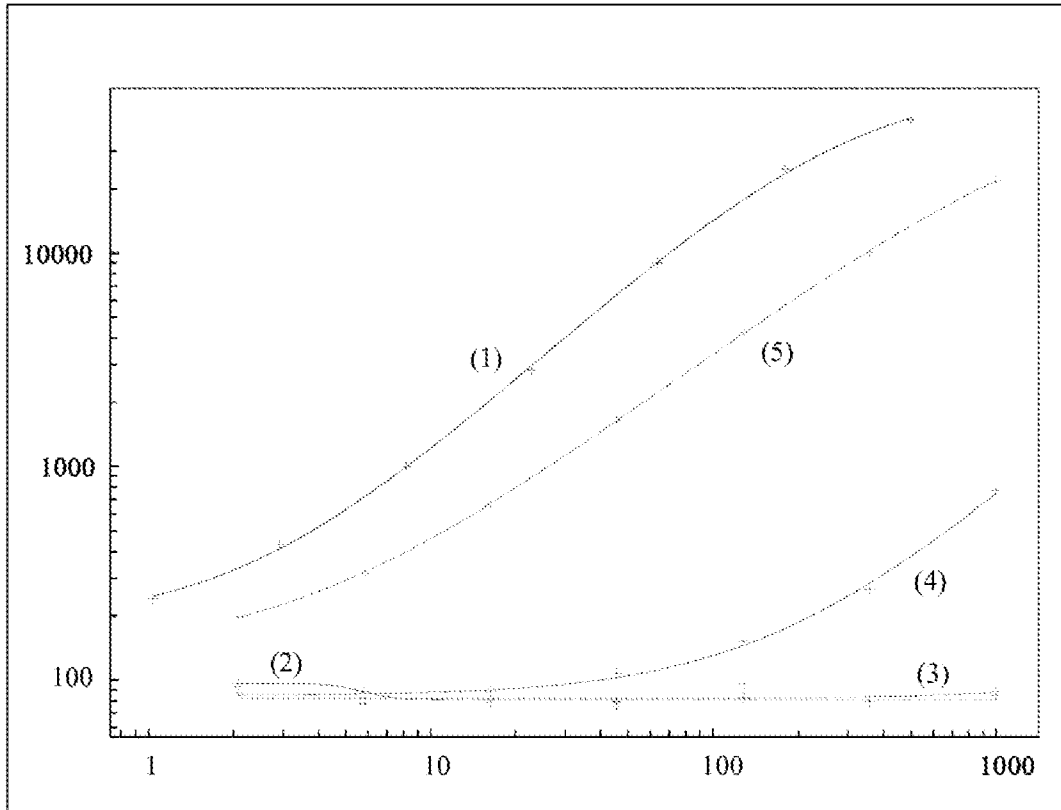


Figura 9

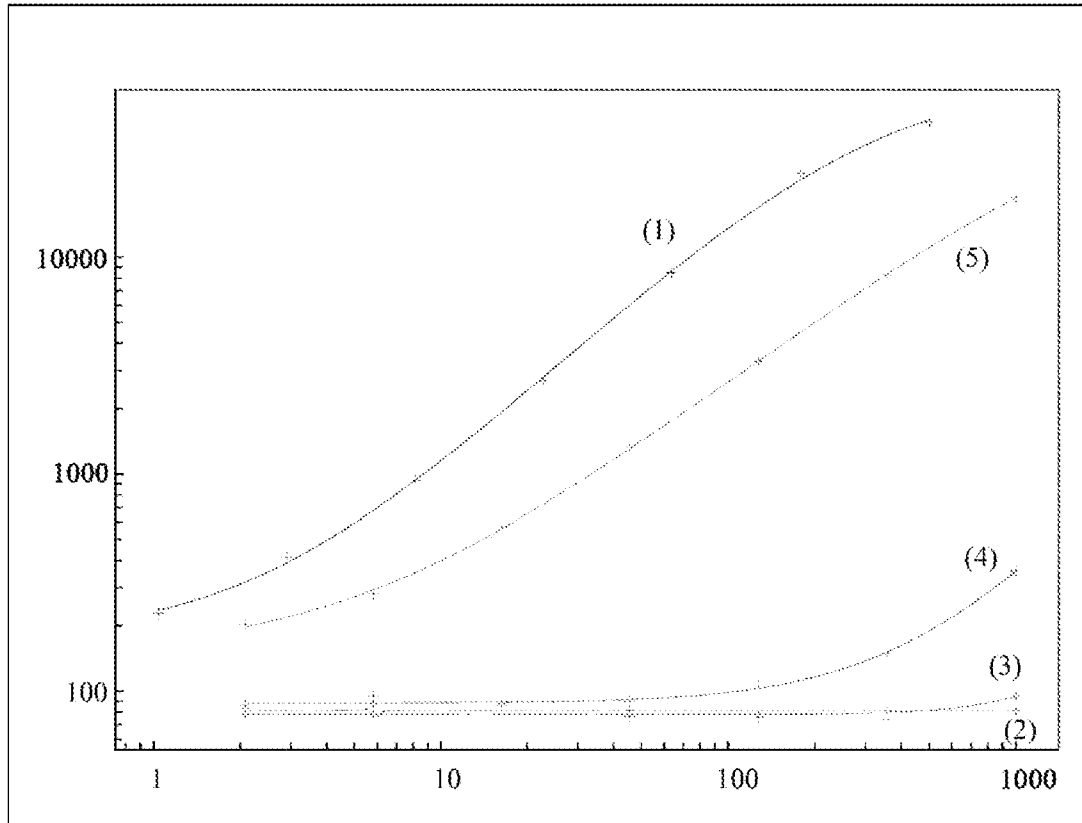


Figura 10

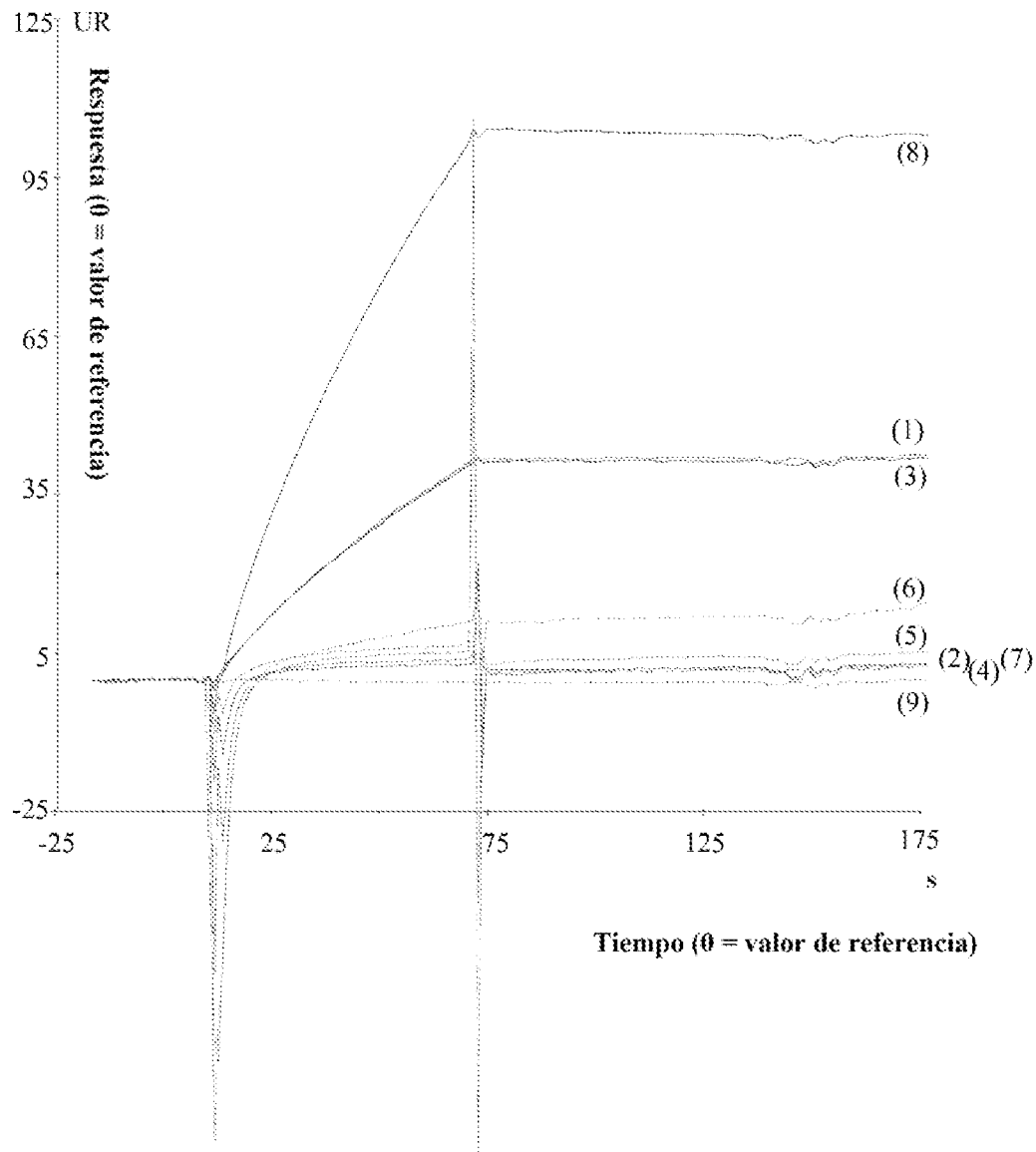


Figura 11

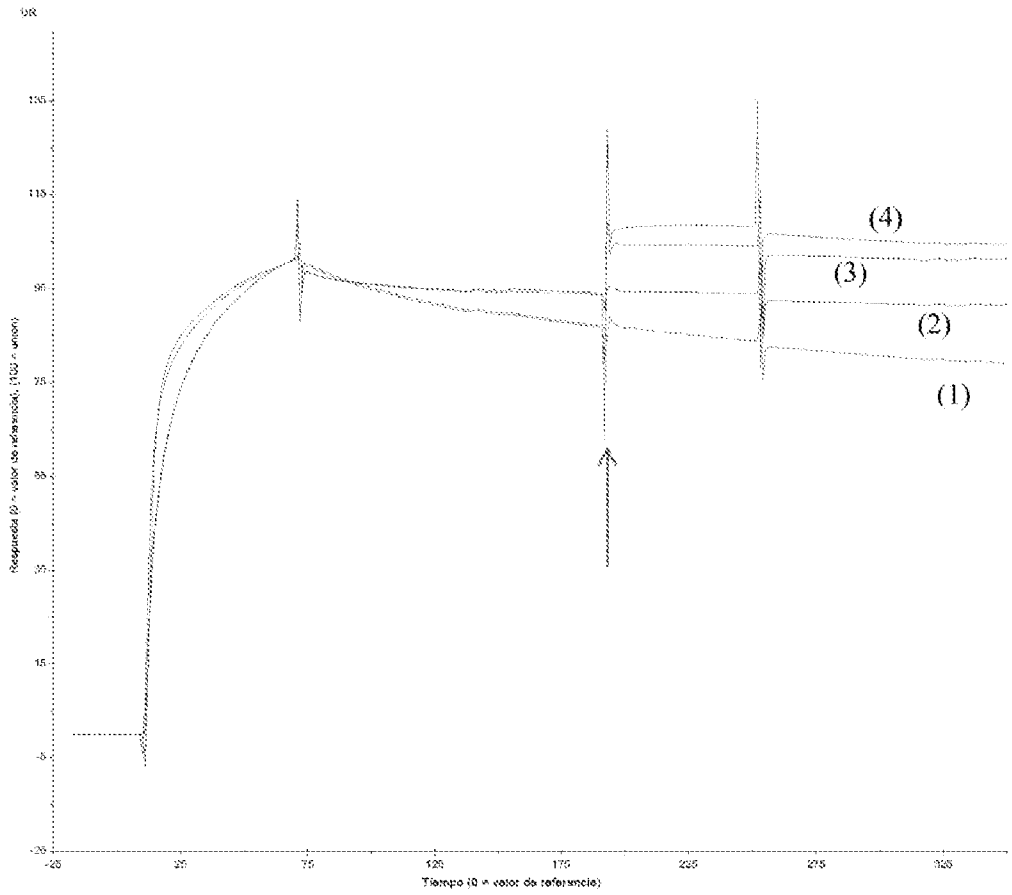


Figura 12

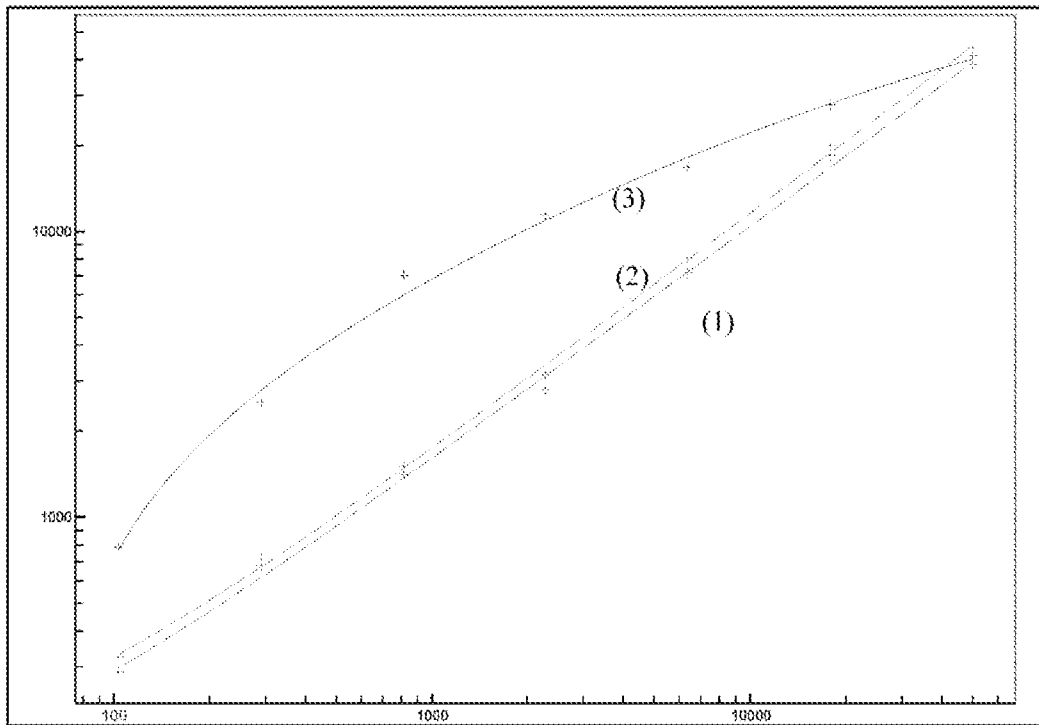


Figura 13

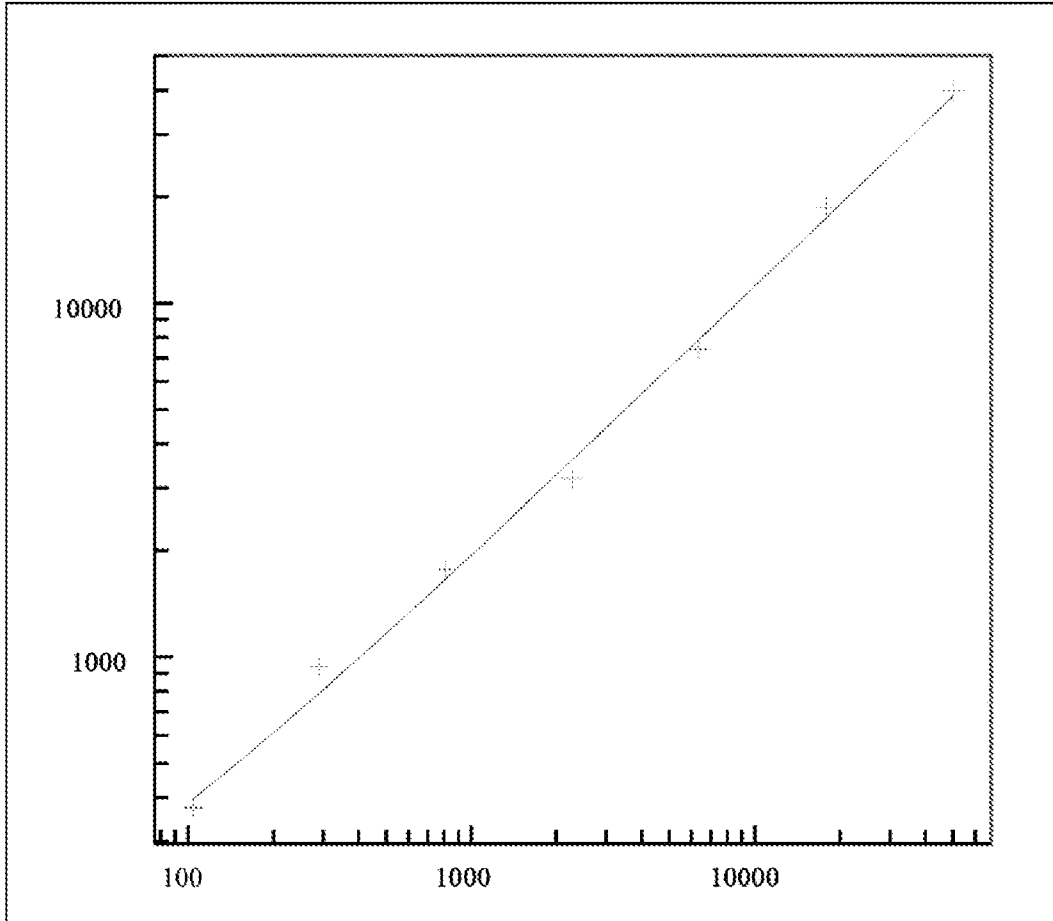


Figura 14

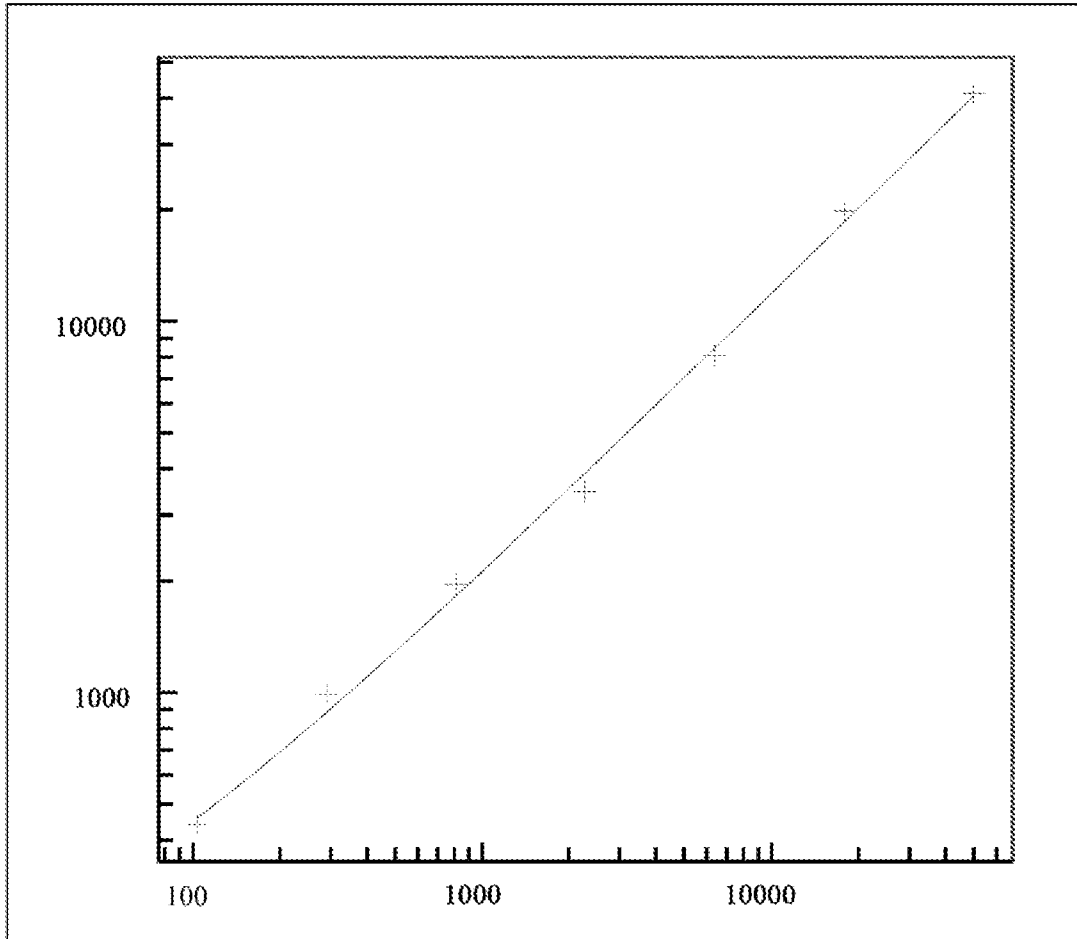


Figura 15

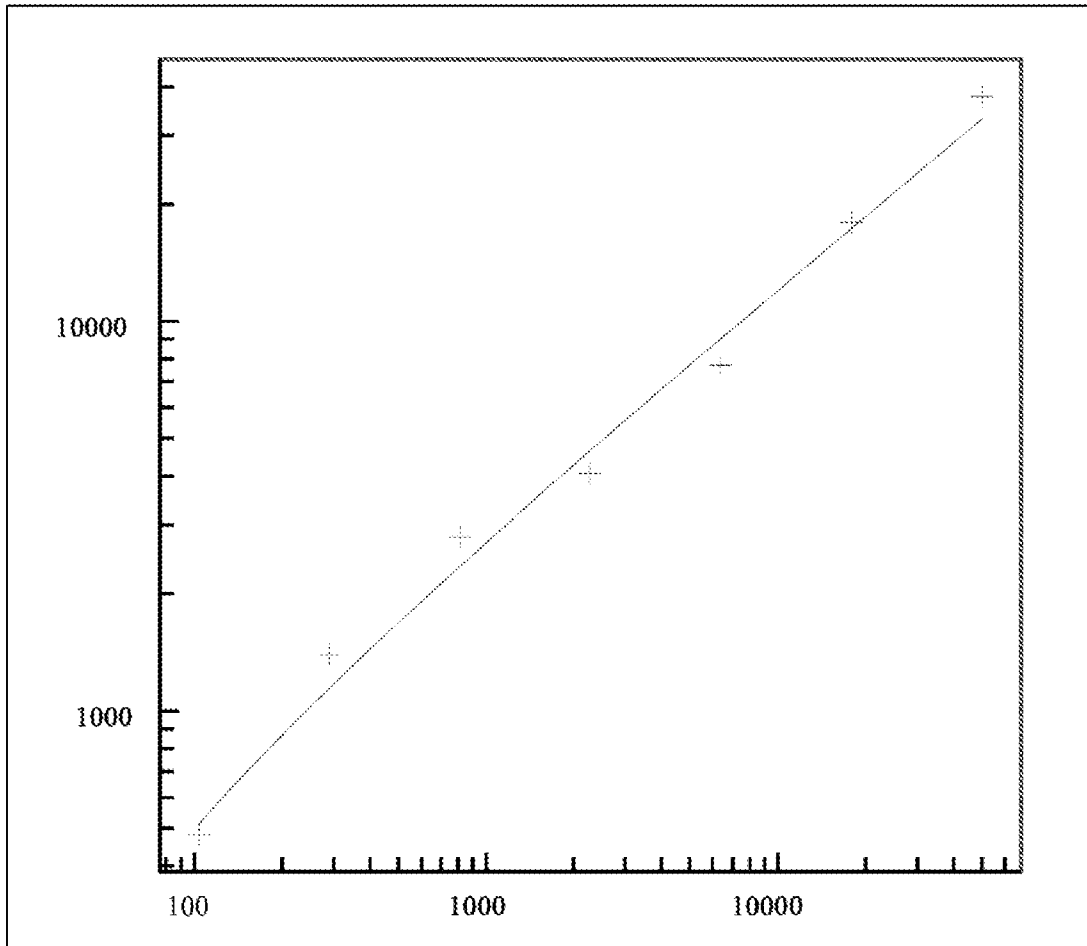


Figura 16

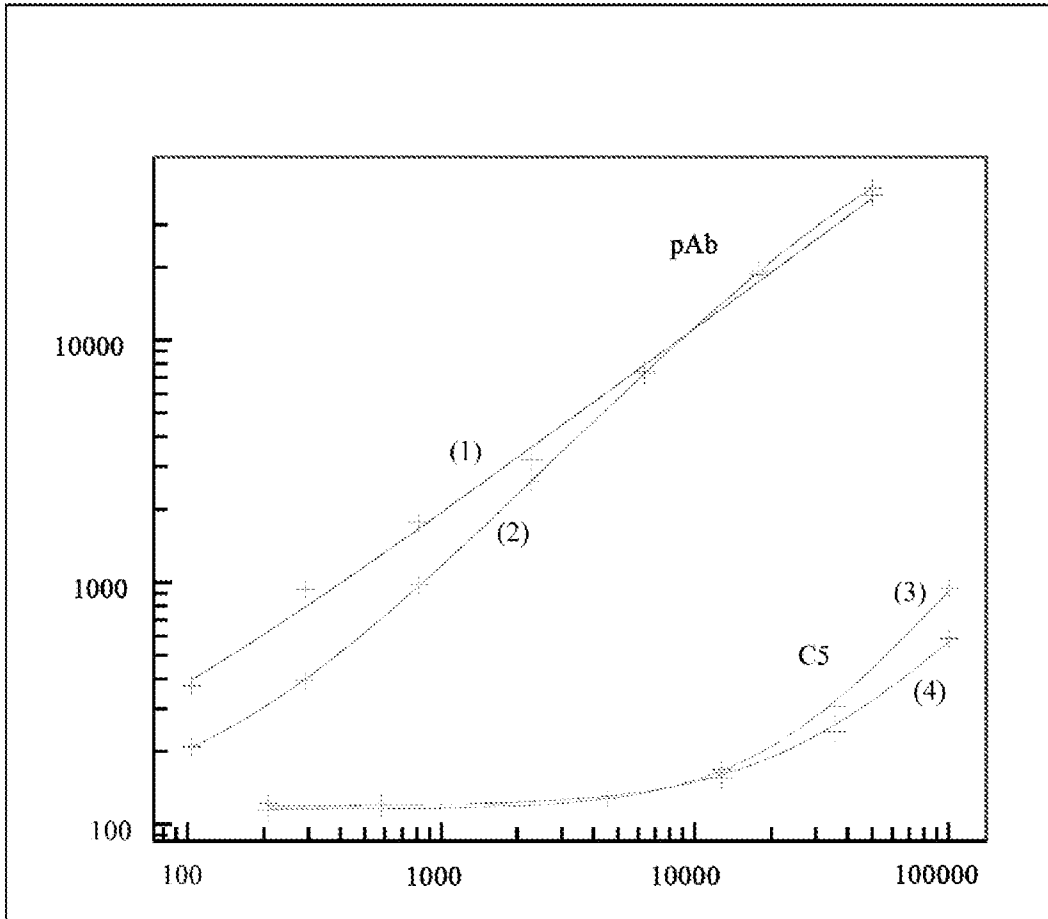


Figura 17

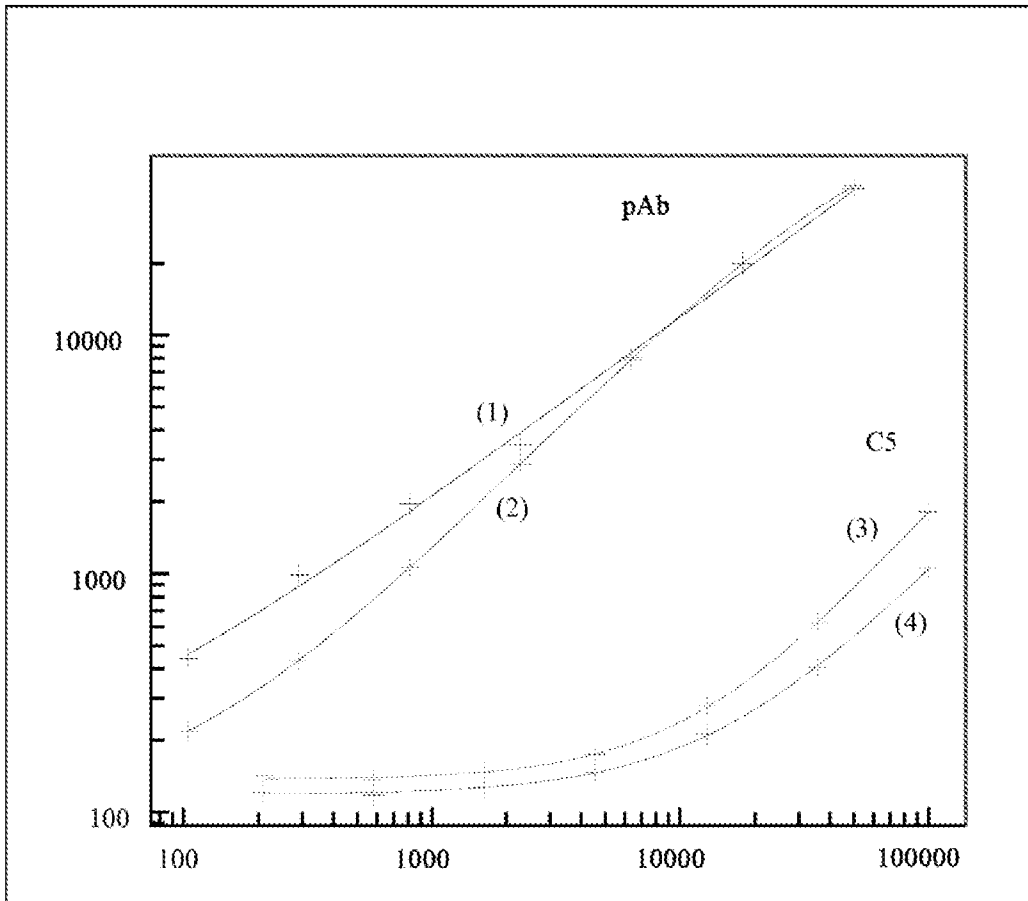


Figura 18

