



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015032960-8 B1



(22) Data do Depósito: 01/07/2014

(45) Data de Concessão: 05/01/2021

(54) Título: IMUNOENSAIO SUPRIMIDO POR INTERFERÊNCIA PARA DETECTAR ANTICORPOS ANTI-FÁRMACO EM AMOSTRAS DE SORO

(51) Int.Cl.: G01N 33/543.

(30) Prioridade Unionista: 04/07/2013 EP 13175091.1.

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

(72) Inventor(es): KAY-GUNNAR STUBENRAUCH; RUDOLF VOGEL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2014063891 de 01/07/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/000865 de 08/01/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/12/2015

(57) Resumo: IMUNOENSAIO SUPRIMIDO POR INTERFERÊNCIA PARA DETECTAR ANTICORPOS ANTI-FÁRMACO EM AMOSTRAS DE SORO. É relatado aqui um ensaio imunosorvente ligado por enzima para a detecção de anticorpos anti-fármaco contra um anticorpo de fármaco em uma amostra compreendendo um anticorpo de fármaco de captura e um anticorpo de fármaco marcador, em que o anticorpo de fármaco de captura e o anticorpo de fármaco de marcadores são empregados em uma concentração de 0,5 (ml)g/ml ou mais, a amostra é incubada simultaneamente com o anticorpo de fármaco de captura e o anticorpo de fármaco de marcadores por 1 a 24 horas, o anticorpo de fármaco de captura e o anticorpo de fármaco de marcadores são derivatizados através de um resíduo de lisina única, a amostra compreende 10% de soro, e IgG humano oligomérico é adicionado à amostra antes da incubação com o anticorpo de fármaco de captura e o anticorpo de fármaco marcador.

**IMUNOENSAIO SUPRIMIDO POR INTERFERÊNCIA PARA DETECTAR
ANTICORPOS ANTI-FÁRMACO EM AMOSTRAS DE SORO**

[0001] É relatado aqui um imunoensaio suprimido por interferência para detectar anticorpos anti-fármaco em amostras de soro a partir de pacientes tratados com um anticorpo anti-inflamatório e usos dos mesmos.

Antecedentes da invenção

[0002] O desenvolvimento clínico de anticorpos terapêuticos novos requer a avaliação de sua imunogenicidade potencial por ensaios apropriados (Kaliyaperumal, A. e Jing, S., Curr. Pharm. Biotechnol. 10 (2009) 352-358). O teste de anticorpo anti-fármaco (ADA) normalmente envolve uma abordagem de dois níveis: (1) ensaios para detecção ADA e (2) ensaios para caracterização de ADA. Ensaios de detecção de ADA incluem ensaios de triagem e confirmação de especificidade (confirmatório). Ensaios imunossorventes ligados por enzimas à base de placa de microtítulo (ELISAs) são ainda o formato mais amplamente usado para selecionar ADAs devido a sua eficiência de rendimento elevado, simplicidade relativa e elevada sensibilidade (Geng, D., e outros, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 364-375). ELISAs ADA são mais frequentemente projetados em um formato de ponte que fornece elevada seletividade, detecção de todos os isotipos e capacidade de detecção ADA de espécie-pan (Mire-Sluis, A.R., e outros, J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16).

[0003] Um ELISA de ligação foi desenvolvido e usado como um ensaio de ADA de triagem e confirmação para um anticorpo anti-IL6R tocilizumab (Stubenrauch, K., e outros, Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609).

[0004] Stubenrauch, K., e outros relatam um ensaio de anticorpo anti-fármaco genérico com tolerância a fármaco em amostras de soro a partir de camundongos

expostos a anticorpos humanos (Anal. Biochem. 430 (2012) 193-199). Bourdage, J. S., e outros relatam o efeito de formato de imunoenensaio de ligação de antígeno duplo sobre dependência de concentração de revestimento de antígeno e implicações para projetar ensaios de imunogenicidade para anticorpos monoclonais (J. Pharm. Biochem. Anal. 39 (2005) 685-690). Mikulskis, A., e outros relatam ELISA de solução como uma plataforma de escolha para desenvolvimento de ensaios de imunogenicidade tolerante a fármaco, robustos em suporte de desenvolvimento de fármaco (J. Immunol. Meth. 365 (2010) 38-49). Pan, J., e outros relatam a comparação do ensaio rápido NIDSA® com métodos ELISA em teste de imunogenicidade de dois bioterapêuticos (J. Pharm. Tox. Meth. 63 (2010) 150-159).

[0005] Em WO 2009/077127 um ensaio de distinção é relatado.

[0006] Qium Z.J., e outros relatam um ensaio à base de biotina-digoxigenina homogêneo novo para a detecção de anticorpos anti-terapêuticos humanos em soro autoimune (J. Immunol. Meth. 362 (2010) 101-111).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] É relatado aqui um ensaio imunossorvente ligado por enzima de ligação (ELISA de ligação) que pode ser usado como ensaio de triagem, confirmação e acompanhamento para a detecção de anticorpos anti-fármaco (ADA) em amostras contendo soro de pacientes tratados com um anticorpo terapêutico. O ensaio como relatado aqui é especialmente útil se a amostra contendo soro for de um paciente com uma doença autoimune como artrite reumatóide (RA).

[0008] O ensaio como relatado aqui mostra uma tolerância aperfeiçoada com relação à quantidade de anticorpo terapêutico na amostra a ser analisada

(tolerância aumentada ao fármaco do ELISA ADA) e ao mesmo tempo o número de resultados de ensaio falso positivo é reduzido.

[0009] Verificou-se que com o ensaio com relatado aqui interferências por fármaco livre e por fatores reumatoides (RF) podem ser minimizadas.

[00010] Esse ensaio é especialmente útil se a amostra contiver anticorpos diferentes de anticorpo anti-fármaco em questão que podem interferir em imunoensaios para a detecção de anticorpos anti-fármaco e, desse modo, responderiam por um resultado de imunoensaio falso positivo.

[00011] Em uma modalidade os métodos como relatados aqui são usados para a determinação de anticorpos anti-fármaco de fármaco-anticorpos usados para uma terapia anti-inflamatória.

[00012] A tolerância aumentada ao fármaco foi obtida por uma interação sinérgica de 1) aumento da concentração de reagentes marcadores e captura biotinilados e digoxigenilados; 2) incubação simultânea em vez de sequencial da amostra de soro com os reagentes marcadores e de captura; 3) tempo de incubação prolongado; 4) uso de reagentes marcadores e de captura mono-acoplados homogeneamente; e 5) uso de um teor de matriz de soro aumentado.

[00013] A interferência a partir de fatores reumatoides pode ser suprimida por adição de imunoglobulina humana oligomérica G (IgG) como um aditivo.

[00014] A tolerância ao fármaco do ensaio ADA suprimido por interferência como relatado aqui é pelo menos 10 vezes mais elevada do que aquela de ensaios conhecidos na técnica.

[00015] Um aspecto como relatado aqui é um

ensaio imunossorvente ligado por enzima para a detecção de anticorpos anti-fármaco contra um fármaco-anticorpo em uma amostra compreendendo um fármaco-anticorpo de captura e um fármaco-anticorpo marcador, em que

[00016] A) o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador são empregados em uma concentração de mais de 0,5 µg/ml,

[00017] B) a amostra é incubada simultaneamente com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador por 4 a 24 horas,

[00018] C) O fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador são derivatizados através de um único resíduo de lisina,

[00019] D) a amostra compreende 7,5% de soro ou mais, e

[00020] E) IgG humano oligomérico é adicionado à amostra antes da incubação com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador.

[00021] Um aspecto como relatado aqui é um ensaio imunossorvente ligado por enzima para a detecção de anticorpos anti-fármaco contra um fármaco-anticorpo em uma amostra de um paciente com artrite reumatóide compreendendo um fármaco-anticorpo de captura e um fármaco-anticorpo marcador, em que

[00022] A) o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de 0,5 µg/ml ou mais no ensaio imunossorvente ligado por enzima,

[00023] B) a amostra é incubada simultaneamente com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador por 0,5 a 24 horas,

[00024] C) o fármaco-anticorpo de captura é um conjugado 1:1 do fármaco-anticorpo de captura e um primeiro componente de um par de ligações específica e o fármaco-

anticorpo marcador é um conjugado 1:1 do fármaco-anticorpo marcador e um rótulo detectável,

[00025] D) a amostra compreende 1% ou mais de soro, e

[00026] E) IgG humano oligomérico é adicionado à amostra antes da incubação com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador.

[00027] Em uma modalidade a amostra compreende 5% ou mais de soro. Em uma modalidade a amostra compreende 7,5% ou mais de soro.

[00028] Em uma modalidade a amostra compreende anticorpos anti-fármaco e fatores reumatoides.

[00029] Em uma modalidade o fármaco-anticorpo é um anticorpo para o tratamento de uma doença inflamatória. Em uma modalidade o anticorpo para o tratamento de uma doença inflamatória é um anticorpo para o tratamento de uma doença autoimune. Em uma modalidade a doença autoimune é artrite reumatóide ou artrite juvenil ou osteoartrite ou doença de Castleman.

[00030] Em uma modalidade o fármaco-anticorpo é um anticorpo para o tratamento de câncer. Em uma modalidade o anticorpo é para o tratamento de mieloma ou plasmacitoma.

[00031] Em uma modalidade o fármaco-anticorpo é um anticorpo contra o receptor IL-6 (anticorpo anti-IL6R), ou contra o receptor IGF-1 (anticorpo anti-IGFR1), ou o receptor IL-13 1 alfa (anticorpo anti-IL13R1alfa), ou contra Ox40L (anticorpo anti-Ox40L), ou contra fator de necrose de tumor alfa (anticorpo anti-TNFalfa). Em uma modalidade o fármaco-anticorpo é um anticorpo anti-IL6R. em uma modalidade o anticorpo anti-IL6R é tocilizumab.

[00032] Em uma modalidade o fármaco-anticorpo de captura é conjugado com uma fase sólida. Em uma modalidade a conjugação do fármaco-anticorpo de captura com

a fase sólida é realizada através de um par de ligações específica. Em uma modalidade o par de ligações específica (primeiro componente/segundo componente) é selecionado entre Estreptavidina ou Avidina/biotina, ou anticorpo/antígeno (vide, por exemplo, Hermanson, G.T., e outros, Bioconjugate TRechniques, Academic Press, 1996), ou lectina/polissacarídeo, ou proteína de ligação de esteroide/esteroide, ou receptor de hormônio/hormônio, ou enzima/substrato, ou IgG/Proteína A e/ou G.

[00033] Em uma modalidade o anticorpo de droga de captura é conjugado com biotina (como primeiro componente de um par de ligações específica). Nesse caso a conjugação com a fase sólida é realizada através de Avidina ou Estreptavidina imobilizada.

[00034] Em uma modalidade o fármaco-anticorpo marcador é conjugado com um rótulo detectável. Em uma modalidade o fármaco-anticorpo marcador é conjugado com o rótulo detectável através de um par de ligações específica. Em uma modalidade o par de ligações específica (primeiro componente/segundo componente) é selecionado entre Estreptavidina ou Avidina/biotina ou anticorpo/antígeno (vide, por exemplo, Hermanson, G.T., e outros, Bioconjugate TRechniques, Academic Press, 1996), ou lectina/polissacarídeo, ou proteína de ligação de esteroide/esteroide, ou receptor de hormônio/hormônio, ou enzima/substrato, ou IgG/Proteína A e/ou G.

[00035] Em uma modalidade, o fármaco-anticorpo marcador é conjugado com digoxigenina (como rótulo detectável). Nesse caso, a ligação ao rótulo detectável é realizada através de um anticorpo contra digoxigenina.

[00036] Em uma modalidade, o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração no ensaio imunossorvente ligado por enzima

(ELISA) de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml. Em uma modalidade, o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de mais de 0,5 µg/ml a menos de 10 µg/ml. Em uma modalidade o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml. Em uma modalidade o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de aproximadamente 1,4 µg/ml a aproximadamente 1,8 µg/ml. Em uma modalidade o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de aproximadamente 1,45 µg/ml a aproximadamente 1,6 µg/ml. Em uma modalidade preferida o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de aproximadamente 1,5 µg/ml.

[00037] Em uma modalidade o tempo de incubação é pelo menos 6 horas. Em uma modalidade o tempo de incubação é pelo menos 12 horas. Em uma modalidade o tempo de incubação é pelo menos 16 horas.

[00038] Em uma modalidade o tempo de incubação é no máximo 24 horas.

[00039] Em uma modalidade o tempo de incubação é entre 4 horas e 24 horas. Em uma modalidade o tempo de incubação é entre 6 horas e 24 horas. Em uma modalidade o tempo de incubação é entre 12 horas e 24 horas. Em uma modalidade preferida o tempo de incubação é entre 12 horas e 20 horas. Em uma modalidade o tempo de incubação é entre 14 horas e 18 horas. Em uma modalidade o tempo de incubação é aproximadamente 16 horas.

[00040] Em uma modalidade a amostra compreende 1 % a 20 % de soro. Em uma modalidade a amostra compreende aproximadamente 10 % de soro.

[00041] Em uma modalidade o IgG humano oligomérico é adicionado a uma concentração final de 10 µg/mL a 1000 µg/mL. Em uma modalidade o IgG humano oligomérico é adicionado a uma concentração final de 15 µg/mL a 500 µg/mL. Em uma modalidade o IgG humano oligomérico é adicionado a uma concentração final de 20 µg/mL a 250 µg/mL. Em uma modalidade o IgG humano oligomérico é adicionado a uma concentração final de 25 µg/mL a 100 µg/mL. Em uma modalidade preferida o IgG humano oligomérico é adicionado a uma concentração final de aproximadamente 50 µg/mL.

[00042] Um aspecto como relatado aqui é um ensaio imunossorvente ligado por enzima para a detecção de anticorpos anti-fármaco contra um anticorpo de droga em uma amostra de um paciente com artrite reumatoide compreendendo um fármaco-anticorpo de captura e um fármaco-anticorpo marcador, em que

[00043] a) o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de aproximadamente 1.5 µg/ml no ensaio imunossorvente ligado por enzima,

[00044] b) a amostra é incubada simultaneamente com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador por 14 a 16 horas,

[00045] c) o fármaco-anticorpo de captura é um conjugado de 1:1 do fármaco-anticorpo de captura e biotina através de um resíduo de lisina do fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador é um conjugado de 1:1 do fármaco-anticorpo marcador e digoxigenina através de um resíduo de lisina do fármaco-anticorpo marcador,

[00046] d) a amostra compreende 1 % a 20 % de soro, e

[00047] e) IgG humano oligomérico é adicionado à amostra a uma concentração final de 25 µg/mL a 100 µg/mL antes da incubação com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador.

[00048] Um aspecto como relatado aqui é o uso de IgG humano oligomérico para a captura de fatores reumatoides em um anticorpo anti-fármaco ELISA.

[00049] Um aspecto como relatado aqui é um método de tratar um indivíduo tendo uma doença que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo terapêutico (fármaco) e determinar a presença de anticorpos anti-fármaco com um ensaio como relatado aqui.

[00050] Um aspecto como relatado aqui é um método de tratar um indivíduo tendo uma doença inflamatória que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-IL6R (fármaco) e determinar a presença de anticorpos de anticorpo anti-anti-IL6R (anticorpos anti-fármaco) com um ensaio como relatado aqui.

[00051] Em uma modalidade a doença inflamatória é uma doença autoimune é selecionada entre artrite reumatóide, artrite juvenil, osteoartrite ou doença de Castleman.

[00052] Em uma modalidade a doença inflamatória é glomerulonefrite proliferativa mesangial.

[00053] Um aspecto como relatado aqui é um método de tratar um indivíduo tendo plasmacitoma compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-IL6R (fármaco) e determinar a presença de anticorpos anticorpo anti-anti-IL6R (anticorpos anti-fármaco) com um ensaio como relatado aqui.

[00054] Um aspecto como relatado aqui é um método de tratar um indivíduo tendo mieloma compreendendo

administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-IL6R (fármaco) e determinar a presença de anticorpos anticorpo anti-anti-IL6R (anticorpos anti-fármaco) com um ensaio como relatado aqui.

[00055] Um aspecto como relatado aqui é um método de inibir atividade IL6R em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-IL6R para inibir atividade IL6R e determinar a presença de anticorpos anticorpo anti-anti-IL6R (anticorpos anti-fármaco) com um ensaio como relatado aqui.

SUMÁRIO DAS FIGURAS

[00056] Figura 1 - princípio de ensaio do ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante a droga exemplificado para anticorpo anti-IL6R tocilizumab.

[00057] Figura 2 - princípio de ensaio do ensaio de anticorpo anti-fármaco suprimido por interferência para anticorpo anti-IL6R tocilizumab.

[00058] Figura 3 - curva de calibragem obtida para o ensaio de anticorpo anti-fármaco suprimido por interferência para anticorpo anti-IL6R tocilizumab.

[00059] Figura 4 - comparação de tolerância a fármaco no ELISA de anticorpo anti-fármaco em duas etapas e no ELISA anticorpo anti-fármaco suprimido por interferência como relatado aqui para o anticorpo anti-IL6R tocilizumab; sinal de 300 ng/mL de anticorpo anti-fármaco na presença de quantidades crescentes de fármaco é mostrado; linha pontilhada: ensaio convencional CP; linha cheia: ensaio suprimido por interferência CP como relatado aqui; linha pontilhada com círculos; ensaio convencional; linha cheia com quadrados; ensaio suprimido por interferência como relatado aqui.

[00060] Figura 5 - determinação de ponto de

corte com o ELISA de anticorpo anti-fármaco suprimido por interferência.

[00061] Figura 6 - determinação de ponto de corte com o ELISA de anticorpo anti-fármaco suprimido por interferência com TCZ-Bi(mono) e TCZ-Dig (mono).

[00062] Figura 7 - variações de sinal usando ELISA convencional em 77 diferentes amostras de soro de pacientes RA tratados com TCZ.

[00063] Figura 8 - variações de sinal utilizando o ELISA suprimido por interferência como relatado aqui em 77 amostras de soro diferentes a partir de pacientes RA tratados com TCZ.

Definições

[00064] O termo "conjugado 1:1" indica um conjugado consistindo exatamente em duas entidades unidas/conjugadas entre si através de uma ligação covalente única. Por exemplo, o termo "conjugado 1:1 do fármaco-anticorpo de captura e um primeiro componente de um par de ligações específica" indica um conjugado químico consistindo exatamente em uma molécula do fármaco-anticorpo de captura covalentemente conjugada através de uma ligação química única exatamente com uma molécula do primeiro componente de um par de ligações específica. De modo semelhante, o termo "conjugado 1:1 do fármaco-anticorpo marcador e um rótulo detectável" indica um conjugado químico consistindo exatamente em uma molécula do fármaco-anticorpo marcador covalentemente conjugado através de uma ligação química única a exatamente uma molécula de rótulo detectável.

[00065] O termo "fármaco-anticorpo" de acordo com a invenção indica um anticorpo que pode ser administrado a um indivíduo, de modo que uma amostra do indivíduo seja suspeita de compreender o fármaco-anticorpo

após administração. Um fármaco-anticorpo é um anticorpo que é destinado a ser administrado a um ser humano para uma finalidade terapêutica. Em um ensaio como relatado aqui o fármaco-anticorpo, o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador compreendem a "mesma" molécula de anticorpo, por exemplo, recombinantemente produzida com o mesmo vetor de expressão e compreendendo a mesma sequência de aminoácido. Fármaco-anticorpos (anticorpos monoclonais terapêuticos) estão sendo usados amplamente para o tratamento de várias doenças como doenças oncológicas (por exemplo, malignidades sólidas e hematológicas incluindo linfoma não de Hodgkin, câncer de mama, e câncer colorretal) ou doenças inflamatórias. Tais anticorpos são relatados, por exemplo, por Levene, A.P., e outros, *Journal of the Royal Society of Medicine* 98 (2005) 145-152; Groner, B., e outros, *Curr. Mol. Meth.* 4 (2004) 539-547; e Harris, M., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292-302.

[00066] Em uma modalidade o fármaco-anticorpo é um anticorpo que é útil para o tratamento de uma doença inflamatória, isto é, um anticorpo anti-inflamatório, como um anticorpo de receptor anti-IL-6, ou um anticorpo de receptor anti-IGF-1, ou um anticorpo de receptor anti-IL-13 1 alfa.

[00067] Um fármaco-anticorpo de exemplo (preferivelmente monoclonal) é um anticorpo contra o receptor IL-6 (anticorpo anti IL6R). Tal anticorpo é, por exemplo, relatado por Mihara, e outros, *Clin. Immunol.* 98 (2001) 319-326; Nishimoto, N., e outros, *Blood* 106 (2005) 2627-2632, in clinical trial NCT00046774, ou em WO 2004/096274.

[00068] Um fármaco-anticorpo de exemplo (preferivelmente monoclonal) é um anticorpo contra o receptor IGF-1 (anticorpo IGF1R). Tal anticorpo é, por

exemplo, relatado em WO 2004/087756 ou em WO 2005/005635.

[00069] Um fármaco-anticorpo de exemplo (preferivelmente monoclonal) é um anticorpo contra o receptor IL-13 alfa (anticorpo anti IL13R1alfa). Anticorpos contra IL-13R1alfa são conhecidos, por exemplo, de WO 96/29417, WO 97/15663, WO 03/080675, Graber, P., e outros, Eur. J. Immunol. 28 (1998) 4286-4298; Poudrier, J., e outros, J. Immunol. 163 (1999) 1153-1161; Poudrier, J., e outros, Eur. J. Immunol. 30 (2000) 3157-3164; Aikawa, M., e outros, Cytokine 13 (2001) 75-84, e são comercialmente disponíveis de, e.g., R&D Systems Inc. USA. Anticorpos exemplares adicionais contra IL-13R1alpha são relatados em WO 2006/072564.

[00070] O termo "fármaco-anticorpo usado para uma terapia anti-inflamatória" como utilizado aqui indica um fármaco-anticorpo que é dirigido contra um receptor de superfície de célula que media inflamação. Tais receptores são, por exemplo, o receptor IL-6, ou o receptor IGF-1, ou o receptor IL13a 1. Se uma amostra de um paciente, que é tratado com tal fármaco-anticorpo anti-inflamatório, for analisada, tem de ser determinado, se o resultado positivo do método se baseia em um anticorpo anti-fármaco verdadeiro (resultado positivo verdadeiro) ou em um anticorpo diferente de um anticorpo anti-fármaco da amostra (resultado positivo falso). Um exemplo de tal caso é uma amostra de um paciente, que tem uma doença autoimune como reumatismo, e desse modo, uma amostra obtida do paciente contém os denominados "fatores reumatoides". O termo "fatores reumatoides" como utilizado aqui indica anticorpos ligando ao IgG humano, para ser mais precisamente à região Fc de IgG humano. Na maioria dos casos, esses "fatores reumatoides" são moléculas de ligação oligomérica.

[00071] O termo "anticorpo anti-fármaco" como

utilizado aqui indica um anticorpo, que é dirigido contra, isto é, se liga a uma região antigênica de um fármaco-anticorpo. Essa região antigênica pode ser a região variável, uma CRD, a região constante, ou a glicoestrutura do fármaco-anticorpo. Em uma modalidade o anticorpo anti-fármaco é dirigido contra uma CRD do fármaco-anticorpo ou uma modificação secundária do fármaco-anticorpo resultando da produção recombinante do fármaco-anticorpo em células recombinantes, como, células CHO, células HEK, células Sp2/0, ou células BHK. Genericamente, anticorpos anti-fármaco são dirigidos contra uma região antigênica de um fármaco-anticorpo que é reconhecido pelo sistema imune de um animal ao qual o fármaco-anticorpo é administrado. Os anticorpos descritos acima são denominados "anticorpos anti-fármaco específicos."

[00072] Fármaco-anticorpos são projetados para compreender o mínimo possível de regiões antigênicas. Por exemplo, fármaco-anticorpos destinados ao uso em seres humanos são humanizados antes da aplicação em um paciente humano para minimizar a geração de uma resposta imune contra o fármaco-anticorpo. Essa resposta imune seria na forma de anticorpos anti-fármaco (ADAs), que são dirigidos contra as partes não humanas de tais fármaco-anticorpos humanizados, como, por exemplo, as regiões de determinação complementar nos domínios variáveis (vide, por exemplo, Pan, Y., e outros, FASEB J. 9 (1995) 43-49).

[00073] O termo "região hipervariável" ou "HVR" como utilizado aqui se refere a cada das regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis em sequência ("regiões de determinação de complementaridade" ou "CDRs") e/ou formam loops estruturalmente definidos ("loops hipervariáveis") e/ou contêm os resíduos de contato de antígeno ("contatos de antígeno"). Genericamente,

anticorpos compreendem seis HVRs: três no VH (H1, H2, H3), e três no VL (L1, L2, L3). HVRs exemplares da presente invenção incluem:

[00074] (a) loops hipervariáveis que ocorrem em resíduos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), e 96-101 (H3) (Chothia e Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

[00075] (b) CDRs que ocorrem em resíduos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), e 95-102 (H3) (Kabat e outros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[00076] (c) contatos de antígeno que ocorrem em resíduos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), e 93-101 (H3) (MacCallum e outros J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); e

[00077] (d) combinações de (a), (b), e/ou (c), incluindo resíduos de aminoácidos HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), e 94-102 (H3).

[00078] A menos que indicado de outro modo, resíduos HVR e outros resíduos no domínio variável (por exemplo, resíduos FR) são numerados aqui de acordo com Kabat.

[00079] Anticorpos contêm um número de frações reativas, como, por exemplo, grupos de amino (grupos de alfa-amino, lisinas), grupos tiol (cistinas, cisteína e metionina), grupos de ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutâmico) e grupos alcoólicos de açúcar. Esses podem ser empregados para acoplar a um partner de ligação como uma superfície, uma proteína, um polímero (como, por exemplo, PEG, Celulose ou Polistírol), uma enzima, ou um

membro de um par de ligações (vide, por exemplo, Aslam M. and Dent, A., Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100).

[00080] O termo "anticorpo anti-idiotípico" indica um anticorpo, que especificamente se liga a uma especificidade de ligação, como, por exemplo, um sítio de ligação, de um anticorpo de origem, isto é, um anticorpo anti-idiotípico é dirigido, por exemplo, contra um sítio de ligação de antígeno de um anticorpo de origem.

[00081] Em uma modalidade, o anticorpo anti-idiotípico se liga especificamente a uma ou mais das CDRs do anticorpo de origem.

[00082] Em uma modalidade o anticorpo de origem é um anticorpo terapêutico. Em uma modalidade, o anticorpo de origem é um anticorpo multiespecífico. Em uma modalidade o anticorpo de origem é um anticorpo biespecífico.

[00083] Um dos grupos reativos mais comuns de proteínas é a ϵ -amina alifática do aminoácido lisina. Em geral, quase todos os anticorpos contêm resíduos de lisina abundantes. Grupos de amino/aminas de lisina são razoavelmente bons nucleófilos acima de pH 8.0 ($pK_a = 9.18$) e, portanto, reagem facilmente e de forma limpa com uma variedade de reagentes para formar ligações estáveis.

[00084] Outro grupo reativo comum em anticorpos é o resíduo de tiol a partir do aminoácido contendo enxofre cistina e seu produto de redução cisteína (ou meia cisteína). Cisteína contém um grupo de tiol livre, que é mais nucleofílico do que aminas e é genericamente o grupo funcional mais reativo em uma proteína. Tióis são genericamente reativos em pH neutro, e, portanto, podem ser acoplados a outras moléculas seletivamente na presença de aminas. Uma vez que grupos de sulfidrila livres são relativamente reativos, proteínas com esses grupos

frequentemente existem com os mesmos em sua forma oxidada como grupos de dissulfeto ou ligações de dissulfeto.

[00085] Além de cistina e cisteína, algumas proteínas têm o aminoácido metionina, que está contendo enxofre em uma ligação de tio éter. A literatura relata o uso de vários reagentes de reticulação de tiolação como reagente de Traut (2-iminotiolano), acetato de succinimidil (acetiltio) (SATA), ou hexanoato de sulfosuccinimidil 6-[3-(2-piridilditio) propionamido] (Sulfo-LC-SPDP) para fornecer modos eficientes de introduzir múltiplos grupos de sulfidril através de grupos amino reativos.

[00086] Ésteres reativos, particularmente ésteres de N-hidroxi succinimida (NHS), estão entre os reagentes mais comumente empregados para modificação de grupos de amina. O pH ótimo para reação em um ambiente aquoso é pH 8,0 a 9,0.

[00087] Isotiocianatos são reagentes de modificação de amina e formam ligações de tioureia com proteínas. Os mesmos reagem com aminas de proteína em solução aquosa (otimamente em pH 9,0 a 9,5).

[00088] Aldeídos reagem sob condições aquosas brandas com aminas aromáticos e alifáticas, hidrazinas, e hidrazidas para formar um intermediário de imina (base de Schiff). Uma base de Schiff pode ser seletivamente reduzida com agentes de redução brando ou forte (como boroidreto de sódio ou cianoboroidreto de sódio) para derivar uma ligação de amina de alquila estável.

[00089] Outros reagentes que foram usados para modificar aminas são anidridos de ácido. Por exemplo, anidrido dietileno triamina penta acético (DTPA) é um agente de quelação bifuncional que contém dois grupos de anidrido reativo com amina. Pode reagir com grupos de ϵ -amina e N-terminal de proteínas para formar ligações de

amida. Os anéis de anidrido abrem para criar braços quelantes de metal multivalentes capazes de ligar apertadamente com metais em um complexo de coordenação.

[00090] O termo "amostra" inclui, porém não é limitado a qualquer quantidade de uma substância a partir de uma coisa viva ou coisa anteriormente viva. Tais coisas vivas incluem, porém não são limitadas a seres humanos, camundongos, macacos, ratos, coelhos, e outros animais. Em uma modalidade, a amostra é obtida de um macaco, especialmente um macaco *cinomolgus*, ou um coelho, ou um camundongo ou rato. Tais substâncias incluem, porém não são limitadas a, em uma modalidade sangue integral, soro, ou plasma de um indivíduo, que são as fontes mais amplamente usadas de amostra em rotina clínica.

[00091] O termo "fase sólida" indica uma substância não fluida, e inclui partículas (incluindo micropartículas e contas) feitas de materiais como polímero, metal (partículas ferromagnéticas, paramagnéticas), vidro e cerâmica; substâncias de gel como sílica, alumina, e géis de polímero; capilares, que podem ser feitos de polímero, metal, vidro, e/ou cerâmica; zeólitos e outras substâncias porosas; eletrodos; placas de microtítulo; tiras sólidas; e cubetas, tubos ou outros recipientes de amostra de espectrômetro. Um componente de fase sólida é distinguido de superfícies sólidas inertes em que uma "fase sólida" contém pelo menos uma fração em sua superfície, que é destinada a interagir com uma substância em uma amostra. Uma fase sólida pode ser um componente estacionário, como um tubo, tira, cubeta ou placa de microtítulo, ou podem ser componentes não estacionários, como contas e micropartículas. Uma variedade de micropartículas que permite fixação tanto não covalente como covalente de proteínas e outras substâncias pode ser

usada. Tais partículas incluem partículas de polímero como poliestireno e poli(metil metacrilato); partículas de ouro como nanopartículas de ouro e coloides de ouro; e partículas de cerâmica como sílica, vidro e partículas de óxido de metal. Vide, por exemplo, Martin, C.R., e outros, *Analytical Chemistry-News & Features*, 70 (1998) 322A-327A, ou Butler, J.E., *Methods* 22 (2000) 4-23.

[00092] Dos cromógenos (corantes e grupos luminescentes ou fluorescentes), enzimas, grupos ativos NMR, partículas de metal, ou haptenos, como digoxigenina, o rótulo detectável é selecionado em uma modalidade. Em uma modalidade o rótulo detectável é digoxigenina. O rótulo detectável também pode ser um grupo de reticulação fotoativável, por exemplo, um grupo de azido ou azirina. Quelatos de metal que podem ser detectados por eletroquimiluminescência são também em uma modalidade grupos emissores de sinais, com preferência específica sendo dada a quelatos de rutênio, por exemplo, um quelato de rutênio (bispíridil)₃²⁻. Grupos de rotulação de rutênio adequados são descritos, por exemplo, em EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511, e WO 92/14138.

[00093] Os princípios de imunoenaios diferentes são descritos, por exemplo, por Hage, D.S. (*Anal. Chem.* 71 (1999) 294R-304R). Lu, B., e outros (*Analyst* 121 (1996) 29R-32R) relatam a imobilização orientada de anticorpos para o uso em imunoenaios. Imunoenaios mediadas por avidina-biotina são relatados, por exemplo, por Wilchek, M., e Bayer, E.A., in *Methods Enzymol.* 184 (1990) 467-469.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00094] É reportado aqui um ensaio de anticorpo anti-fármaco suprimido por interferência utilizando amostras de soro com tolerância aumentada a anticorpo

terapêutico livre e resistência aumentada à interferência de fator reumatoide.

[00095] O princípio de um ensaio de anticorpo anti-fármaco é a captura de anticorpos anti-fármaco (ADAs) em um complexo com fármaco digoxigenilado (fármaco-Dig) e fármaco biotinilado (fármaco-Bi) (por exemplo, tocilizumab (TCZ-Dig e TCZ-Bi, respectivamente)), o último levando à imobilização sobre uma placa revestida de estreptavidina (SA-MTP). O complexo ADA/fármaco-Dig ligado ao fármaco-Bi no SA-MTP é detectado por um conjugado de enzima de peroxidase de rábano de anticorpo anti-digoxigenina (anti-Dig-HRP). A peroxidase de rábano (HRP) catalisa uma reação de cor do substrato ABTS. A intensidade de cor é proporcional à concentração do analisado. O princípio geral de um ensaio de anticorpo anti-fármaco é mostrado na figura 1.

[00096] Verificou-se que sem alteração do princípio de ensaio geral e tolerância a fator reumatoide e fármaco de um ensaio de anticorpo anti-fármaco convencional poderia ser aumentada por

[00097] 1) aumentar a concentração de reagentes marcadores e de captura biotinilado e digoxigenilado;

[00098] 2) incubação simultânea, em vez de sequencial, da amostra de soro com os reagentes marcadores e de captura;

[00099] 3) incubação prolongada da amostra de soro com os reagentes marcadores e de captura;

[000100] 4) uso de reagentes marcadores e de captura homogêneos em vez de uma mistura heterogeneamente acoplada;

[000101] 5) uso de uma matriz de soro aumentado;

[000102] 6) inclusão de IgG oligomérico como aditivo de ensaio; e

[000103] 7) uso de anticorpo marcador mono digoxigenilado e de captura biotinilado.

[000104] Essas medidas forneceram um efeito sinérgico.

[000105] As medidas acima levam a um ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco com interferência suprimida para a detecção de anticorpos anti-fármaco contra um fármaco-anticorpo terapêutico.

[000106] O princípio geral do ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui é mostrado na figura 2 exemplificada para o anticorpo anti-IL6R tocilizumab.

[000107] Com a montagem de ensaio como relatado aqui a tolerância a fármaco do ensaio ADA foi aumentada pelo menos 10 vezes em amostras de soro a partir de pacientes comparado com um ensaio de anticorpo anti-fármaco convencional. Ao mesmo tempo a suscetibilidade a fatores reumatóides levando a resultados de ensaio falso-positivos foi também diminuída.

[000108] O anticorpo anti-inflamatório terapêutico tocilizumab (TCZ) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra o receptor de interleucina-6. Foi mostrado como sendo eficaz em estudos clínicos de artrite reumatóide ((Ohsugi, Y. and Kishimoto, T., Expert Opin. Biol. Ther. 8 (2008) 669-681). O ensaio de triagem e confirmação ADA usado nesses estudos mostra tolerância suficiente ao fármaco para concentrações de soro TCZ típicas atingidas em estado constante utilizando um regime de dosagem intravenoso.

[000109] Porém vias de administração diferentes, como administração subcutânea, administração mais frequente, e novas indicações em crianças poderiam resultar

em concentrações de soro TCZ mais elevadas em estado constante.

[000110] Adicionalmente, por exemplo, fatores reumatoides (RF) são frequentemente aumentados em pacientes com doenças autoimunes, como, por exemplo, pacientes com artrite reumatoide. RFs demonstram uma ligação preferencial a gama globulinas agregadas e são envolvidos no mecanismo de clearance de complexos imunes in vivo (Tatarewicz, S., e outros, J. Immunol. Methods. 357 (2010) 10-16). RFs são preferencialmente do isotipo imunoglobulina pentamérica M (IgM) (Artandi, S.E., e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 94-98) e podem não especificamente se ligar com multivalência e afinidade de meio à parte constante do anticorpo terapêutico levando a um resultado falso positivo em um ensaio ADA. Por exemplo, anticorpo IgM anti-humano de Coelho purificado por afinidade foi incluído no diluente de amostra para superar a interferência de anticorpo IgM reativa cruzada em amostras RA (vide, por exemplo, Araujo, J., e outros, J. Pharm. Biomed. Anal., 55 (2011) 1041-1049).

[000111] Verificou-se que ligação não específica de RF presente na amostra de soro ao anticorpo terapêutico poderia ser evitada por adição de IgG humano oligomérico à amostra antes de executar o ensaio ADA. O IgG oligomérico adicionado provê alvos adicionais para o RF e no máximo elimina a interferência de RF no ensaio ADA como relatado aqui.

[000112] A seguir o ensaio de ADA com interferência suprimida como relatado aqui é exemplificado pela análise de amostras de soro de pacientes com artrite reumatoide tratados com tocilizumab (TCZ).

[000113] Medidas para aumentar a tolerância ao fármaco do ensaio de anticorpo anti-fármaco convencional

para detectar anticorpos anti-fármaco contra o anticorpo anti-IL6R tocilizumab foram

[000114] 1) aumentar a concentração de TCZ biotinilado e digoxigenilado (por exemplo, de 0,5 µg/mL a 1,5 µg/mL);

[000115] 2) incubação simultânea da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig;

[000116] 3) Incubação prolongada da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig (por exemplo, de 1 hora a 16 horas);

[000117] 4) uso somente de reagentes TCZ-Bi e TCZ-Dig acoplados com lisina em vez de uma mistura de reagentes acoplados com lisina e carboidrato;

[000118] 5) uso de um teor aumentado de matriz de soro; e

[000119] 6) adição de IgG humano oligomérico à amostra antes da incubação de TCZ-Bi e TCZ-Dig.

Tolerância a fármaco

[000120] Concentrações do anticorpo anti-IL6R tocilizumab a ser detectado em amostras clínicas são 0,5 µg/mL ou mais elevadas, frequentemente na faixa de 1 µg/mL a 10 µg/mL.

[000121] A tolerância ao fármaco do ensaio de anticorpo anti-fármaco convencional foi avaliado por determinar a concentração TCZ mais elevada na qual uma concentração dada de ADA de controle positivo pode ser detectada acima do ponto de corte. A Tabela 1 apresenta um sumário dos resultados.

Tabela 1: determinação de tolerância ao fármaco (tocilizumab) no ELISA de anticorpo anti-fármaco convencional. Valores de sinal alinhados na esquerda estão abaixo do ponto de corte

específico de placa de 0.136 AU.

	tocilizumab [µg/mL]					
	6250	1250	250	50	10	0
ADA A1:G11[ng/mL]	média de sinal [AU]					
100000	0.049	0.109	0.949	3.094	3.169	3.144
10000	0.050	0.062	0.156	1.265	3.117	3.387
1000	0.052	0.058	0.071	0.189	0.865	2.141
500.0	0.051	0.057	0.065	0.120	0.448	1.282
250.0	0.055	0.060	0.065	0.092	0.255	0.703
125.0	0.056	0.060	0.064	0.076	0.157	0.385
62.5	0.056	0.060	0.062	0.067	0.108	0.226
0	0.059	0.061	0.062	0.062	0.060	0.071

[000122] Uma concentração de ADA de 125 ng/mL foi detectada e testada positiva na presença de 10 µg/mL de TCZ.

[000123] A tolerância ao fármaco do ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui foi avaliada por determinar a concentração de TCZ mais elevada na qual uma concentração dada de ADA de controle positivo pode ser detectada acima do ponto de corte. A Tabela 2 apresenta um sumário dos resultados.

[000124] Tabela 2: Determinação de tolerância ao fármaco (tocilizumab) no ELISA anticorpo anti-fármaco tolerância a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui. Valores de sinal alinhados na esquerda estão abaixo do ponto de corte específico de placa de 0.045 AU.

	tocilizumab [µg/mL]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ng/mL]	média de sinal [AU]					

10	0.948	2.263	3.266	3.536	3.146	3.272
3	0.310	0.943	1.956	> 3.5	2.860	3.161
1	0.119	0.364	0.789	1.051	1.180	2.292
300	0.055	0.133	0.280	0.376	0.426	0.857
100	0.033	0.057	0.105	0.144	0.163	0.310
30	0.027	0.036	0.051	0.063	0.068	0.113
10	0.022	0.025	0.032	0.039	0.040	0.056
0	0.024	0.023	0.026	0.027	0.027	0.027

[000125] No ELISA de anticorpo anti-fármaco tolerante ao fármaco com interferência suprimida como relatado aqui uma concentração de ADA muito baixa de 30 ng/mL foi detectada e testada positiva na presença de 10 µg/mL de TCZ. Além disso, as concentrações de ADA de 100 ng/mL e 300 ng/mL mostram uma tolerância a fármaco-anticorpo de 30 µg/ml e mesmo 100 µg/mL, respectivamente.

[000126] Em comparação com os mesmos experimentos conduzidos com o ELISA de anticorpo anti-fármaco convencional de duas etapas anteriormente usado para tocilizumab revelou uma tolerância de fármaco pelo menos 10 vezes mais elevada com o ensaio de interferência suprimida (vide também a figura 4 para 300 ng/mL de concentração de ADA).

[000127] A tolerância ao fármaco do ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante ao fármaco com interferência suprimida como relatado aqui com conjugados 1:1 de biotina e digoxigenina ligados monovalentes ao fármaco-anticorpo de captura e marcadores, respectivamente, foi avaliada por determinar a concentração de TCZ mais elevada na qual uma concentração dada de ADA de controle positivo pode ser detectada acima do ponto de corte. A Tabela 3 apresenta um sumário dos resultados.

[000128] Tabela 3: determinação de tolerância ao fármaco (tocilizumab) no ELISA de anticorpo anti-fármaco

tolerante a fármaco com interferência suprimida com conjugados 1:1 de biotina e digoxigenina ao fármaco-anticorpo marcador e de captura como relatado aqui. Valores de sinal alinhados à esquerda estão abaixo do ponto de corte específico de placa de 0.037 AU.

	tocilizumab [µg/mL]					
	80	70	60	50	5	0
ADA [ng/mL]	média de sinal [AU]					
500	0.090	0.097	0.112	0.122	0.380	1.071
250	0.057	0.061	0.067	0.075	0.215	0.653
125	0.043	0.045	0.048	0.053	0.133	0.343
0.0	0.025	0.024	0.026	0.027	0.030	0.027

[000129] No ELISA de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui uma concentração de ADA de 250 ng/mL foi detectada e testada positiva na presença de 80 µg/mL TCZ.

Supressão de interferência:

[000130] Dezesseis amostras de soro clínicas foram analisadas por um ensaio de anticorpo anti-fármaco convencional como descrito em Stubenrauch e outros (supra). Os resultados são resumidos na tabela 4a.

[000131] Tabela 4a: Resultados da análise de 16 amostras de soro a partir de pacientes com artrite reumatóide tratados com tocilizumab com o ensaio ADA de acordo com Stubenrauch e outros (supra).

no. de amostra	ensaio ADA convencional
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+

6	+
7	+
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	+

[000132] Sem alteração do princípio de ensaio, uma série de medidas foi tomada para obter um ELISA de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui.

[000133] Essas são:

[000134] 1) aumentar a concentração de TCZ biotinilada e digoxigenilada (por exemplo, de 0,5 µg/mL para 1,5 µg/mL);

[000135] 2) incubação simultânea da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig;

[000136] 3) incubação prolongada da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig (por exemplo, de 1 hora a 16 horas);

[000137] 4) uso de reagentes TCZ-Bi e TCZ-Dig somente acoplados com lisina em vez de uma mistura de reagentes acoplados com lisina e carboidrato;

[000138] 5) uso de um teor aumentado de matriz de soro; e

[000139] 6) adição de IgG humano oligomérico à amostra antes da incubação de TCZ-Bi e TCZ-Dig.

[000140] Os resultados como obtidos com o ensaio com interferência suprimida como relatado aqui são

mostrados na seguinte Tabela 4b.

Tabela 4b: análise comparativa de 16 amostras de soro a partir de pacientes com artrite reumatóide tratados com tocilizumab com o ensaio de ADA com interferência suprimida convencional e o aqui relatado

no. de amostra	ensaio ADA convencional	ensaio ADA com interferência suprimida
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	+
16	+	-

[000141] Verificou-se que se somente uma parte das medidas como delineado acima foi tomada a redução de interferência não era suficiente e ainda uma suscetibilidade à interferência por fatores de reumatoide existiu resultando em resultados de ensaio de ADA falso-positivos.

[000142] Se, por exemplo, somente as medidas

[000143] 1) aumentar a concentração de TCZ biotinilada e digoxigenilada (por exemplo, de 0,5 µg/mL para 1,5 µg/mL);

[000144] 2) incubação simultânea da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig;

[000145] 3) incubação prolongada da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig (por exemplo, de 1 hora a 16 horas);

[000146] 4) uso de reagentes TCZ-Bi e TCZ-Dig somente acoplados com lisina em vez de uma mistura de reagentes acoplados com lisina e carboidrato; e

[000147] 5) uso de um teor aumentado de matriz de soro;

[000148] Foi tomada a redução não total de suscetibilidade a resultados de ensaio falso positivos pode ser vista. Os dados comparativos são mostrados na tabela 4c.

[000149] Tabela 4c: análise comparativa de 16 amostras de soro a partir de pacientes com artrite reumatoide tratados com tocilizumab com os formatos diferentes do ensaio de ADA.

	Ensaio ADA com interferência suprimida como relatado aqui	
no. de amostra	Sem aditivo	Com aditivo
1	+	+
2	+	+
3	+	+

4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	-
9	-	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	+
16	+	-

[000150] A avaliação comparativa de 258 amostras de soro diferentes a partir de pacientes com RA tratados com TCZ com o ensaio ADA convencional e o ensaio de ADA tolerante a droga com interferência suprimida como relatado aqui mostrou os mesmos resultados positivos em 12 amostras. O ensaio convencional mediu 27 pacientes de placebo positivos ao passo que o ensaio de ADA tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui somente 4. Em conclusão, o conjunto de medidas como descrito aqui e a adição de IgG humano oligomérico como um aditivo de ensaio de ADA conferiu tolerância aumentada a fármaco e interferência suprimida por RF em comparação com o ensaio ADA convencional.

[000151] Uma análise de subconjunto de dados acima mencionados é mostrada na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7

paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P1	+	0.812	+	0.110
P2	+	1.009	+	0.893

P2	-	0.097	+	0.088
P2	+	0.276	+	0.228
P3	+	0.349	+	0.566
P3	+	2.405	+	1.760
P3	+	1.307	+	1.001
P4	+	1.409	+	0.242
P5	+	0.219	+	0.060
P6	+	0.387	+	0.688
P6	+	3.689	+	3.721
P6	+	3.506	+	3.722
P7	+	0.771	+	0.058

[000152] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0,058 (ELISA com interferência suprimida);
+: resultado de ELISA positivo; -: resultado de ELISA negativo

[000153] Na tabela 8a sinais de ensaio para 27 pacientes de placebo não tratados com TCZ são mostrados. Devido à ausência de ADA induzida por tratamento com TCZ, sinais de ensaio elevado nesse grupo não são esperados e indicariam uma interferência potencial.

Tabela 8a

Paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P8	+	0.270	-	0.032
P8	+	0.231	-	0.033
P9	+	3.736	-	0.055
P9	+	3.297	+	0.058
P9	+	2.863	-	0.046
P9	+	3.739	-	0.052
P1	+	0.812	+	0.110
P10	+	0.755	-	0.021
P10	+	0.635	-	0.021
P11	+	0.272	-	0.020
P11	+	0.271	-	0.021

P11	+	0.234	-	0.020
P12	+	1.157	-	0.027
P12	+	1.362	-	0.028
P12	+	1.149	-	0.029
P4	+	0.522	-	0.033
P4	+	1.409	+	0.242
P4	+	0.651	-	0.047
P13	+	0.349	-	0.023
P14	+	0.245	-	0.033
P14	+	0.276	-	0.035
P14	+	0.275	-	0.037
P15	+	0.580	-	0.049
P7	+	0.990	-	0.056
P7	+	0.822	-	0.052
P7	+	0.523	-	0.042
P7	+	0.771	+	0.058

[000154] Ponto de corte relacionado a estudo (CP): 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida); +: resultado ELISA positivo; -: resultado ELISA negativo

[000155] O padrão de sinal dos dois ensaios é muito diferente: embora todas as 27 amostras de placebo fossem determinadas como sendo positivas utilizando o ELISA convencional, porém somente 4 das 27 amostras foram determinadas como sendo positivas com o ELISA com interferência suprimida como relatado aqui.

[000156] Além dos pacientes tratados com placebo amostras de pacientes tratados com TCZ foram analisadas. Na Tabela 8b os resultados para os pacientes antes do tratamento com TCZ são mostrados. Na Tabela 8c os resultados para pacientes tratados com TCZ são mostrados.

Tabela 8b.

Paciente	Ponto de tempo	ELISA convencional	ELISA com interferência suprimida	dosagem
----------	----------------	--------------------	-----------------------------------	---------

P2	linha de base	+	1.009	+	0.893	4
P16	linha de base	+	0.745	-	0.021	8
P17	linha de base	+	0.281	-	0.020	8
P18	linha de base	+	1.401	-	0.023	4

[000157] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida);
 +: resultado de ELISA positivo; -: resultado de ELISA negativo

Tabela 8c

Paciente	Ponto de tempo	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida		dosagem
P19	semana 24	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	semana 24	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	semana 4	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	semana 8	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	semana 4	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	semana 8	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	semana 24	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	semana 4	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	semana 4	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	semana 24	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	semana 28	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	semana 4	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg
P3	semana 8	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	semana 8	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	semana 4	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	semana 12	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	semana 24	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	semana 4	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg
P17	semana 4	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg
P17	semana 8	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
P18	semana 4	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg

P18	semana 4	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
P5	semana 28	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	semana 12	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	semana 24	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P6	semana 8	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P22	semana24	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

[000158] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida);
 +: resultado de ELISA positivo; -: resultado de ELISA negativo

[000159] O ensaio como relatado aqui fornece um benefício independente do anticorpo terapêutico e do alvo empregado. Isso é mostrado na Tabela a seguir para um anticorpo anti-IL6R, um anticorpo anti-IGF-1R, um anticorpo anti-IL13Ralfa, um anticorpo anti-OX40L e um anticorpo anti-Abeta utilizando amostras de pacientes sendo diagnosticados positivos para artrite reumatoide.

Tabela 9a: anticorpo anti-IL6R

Paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P23	+	0.169	-	0.079
P24	+	0.197	-	0.082
P25	+	0.240	-	0.110
P26	-	0.131	-	0.088
P27	+	0.215	-	0.111
P28	+	0.199	-	0.136
P29	-	0.135	-	0.085
P30	+	0.220	-	0.086
P31	+	0.158	-	0.100
P32	+	0.221	-	0.132
P33	-	0.110	-	0.081
P34	-	0.099	-	0.090
P35	-	0.100	-	0.082
P36	-	0.098	-	0.076

CP	0.157	0.140
----	-------	-------

Tabela 9b: anticorpo anti-IGF-1R

Paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P23	-	0.153	-	0.127
P24	+	0.423	-	0.132
P25	+	0.266	-	0.145
P26	-	0.171	-	0.163
P27	-	0.152	-	0.132
P28	-	0.133	-	0.120
P29	+	0.245	-	0.124
P30	-	0.173	-	0.142
P31	-	0.152	-	0.115
P32	-	0.172	-	0.131
P33	-	0.131	-	0.134
P34	-	0.124	-	0.115
P35	+	0.189	+	0.189
P36	-	0.157	-	0.154
CP	0.176		0.185	

Tabela 9c: anticorpo anti-IL13Ralfa

Paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P23	+	0.556	-	0.080
P24	+	0.881	+	0.198
P25	+	2.192	+	0.761
P26	+	0.674	+	0.235
P27	+	0.604	-	0.044
P28	+	0.177	-	0.000
P29	-	0.000	-	0.006
P30	+	0.424	-	0.091
P31	+	0.342	-	0.000
P32	+	0.353	-	0.092
P33	+	0.208	-	0.021

P34	-	0.000	-	0.000
P35	-	0.079	-	0.097
P36	+	0.238	+	0.235
CP	0.100		0.100	

Tabela 9d: anticorpo anti-OX40L

Paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P23	+	0.148	-	0.073
P24	+	0.477	-	0.066
P25	+	0.414	+	0.087
P26	-	0.103	-	0.067
P27	+	0.137	-	0.072
P28	+	0.211	+	0.126
P29	-	0.116	-	0.074
P30	+	0.436	-	0.064
P32	+	0.198	-	0.079
P33	+	0.122	-	0.078
P34	-	0.096	-	0.070
P35	-	0.088	-	0.067
P36	+	0.121	-	0.076
CP	0.117		0.085	

Tabela 9e: anticorpo anti-Abeta

Paciente	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida	
P25	+	0.063	-	0.025
P26	-	0.025	-	0.026
P28	+	0.086	+	0.080
P29	-	0.020	-	0.021
P30	-	0.037	-	0.022
P31	-	0.036	-	0.024
P32	-	0.029	-	0.024
P33	-	0.027	-	0.026
P34	+	0.069	+	0.069

P35	-	0.019	-	0.021
P36	-	0.033	-	0.032
CP	0.044		0.042	

[000160] Os seguintes exemplos e figuras são fornecidos para auxiliar a compreensão da presente invenção, cujo escopo verdadeiro é exposto nas reivindicações apensas. É entendido que modificações podem ser feitas nos procedimentos expostos sem se afastar do espírito da invenção.

EXEMPLOS

Materiais e métodos

[000161] Imunoglobulina humana agrupada purificada classe G (IgG) foi preparada como descrito por Stubenrauch e outros (Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196). Brevemente, soro humano agrupado de doadores saudáveis foi deslipidado com Aerosil (dióxido de silício, 1,5% (peso/v)) e precipitado com sulfato de amônio (ad 2.0 M). A pelota foi homogeneizada em tampão de fosfato e dialisada contra tampão de fosfato, pH 7.0. a mistura foi separada por cromatografia de permuta de íons DEAE em pH 7,0 e o IgG no fluxo através foi concentrado a 5,93 mg/mL e purificado por filtração de gel.

[000162] Conjugado de anti-digoxigenina-peroxidase de rábano (HRP) policlonal (fragmentos Fab) foi obtido da Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha (no. Do cat. 11633716). Anticorpos anti-TCZ de coelho policlonal (0,5 mg-equivalente/mL) usados como controles de qualidade positiva (QC) e padrões de calibração (CS) foram preparados como descrito por Stubenrauch e outros (supra).

[000163] Amostras de soro humano individuais foram fornecidas pelo banco de soro de Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemanha. Matriz de soro humano agrupado

para controle negativo foi fornecida por TCS Biosciences Ltd., Buckingham, RU.

[000164] Os seguintes reagentes foram obtidos da Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha: substrato de 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) (cat. no. 11684302-001), o tampão de lavagem para o ELISA: solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0.01 M KH_2PO_4 , 0.1 M Na_2HPO_4 , 1.37 M NaCl , 0.027 M KCl ; pH 7.0)/ 0,05% polisorbato 20 (Tween 20) (cat. no. 11332465-001) e o ponto Universal pronto para uso (cat no.4742672) que foi usado como um tampão de diluição no ELISA. Todos os produtos químicos eram do tipo analítico.

[000165] Placas de microtítulo revestidas com estreptavidina (SA-MTP) foram obtidas junto a MicroCoat Biotechnologie GmbH, Bernried. Placas com 96-microcavidades Nunc não revestidas eram da Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Alemanha (cat, no. 442587) e usadas para pré-incubação.

Ensaio de anticorpo anti-fármaco convencional:

[000166] O ensaio foi realizado em temperatura ambiente. Na primeira etapa, TCZ-Bi foi ligado a SA-MTPs em uma concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ por incubar 100 μL em um agitador a 400 rpm por 1 hora. Antes de adicionar a solução de pré-incubação a SA-MTPs, o TCZ-Bi não ligado em excesso foi removido por lavagem 3 vezes. Em paralelo com o procedimento de revestimento, pré-incubação de padrões e amostras foi realizada em duplicata em uma placa de 96 cavidades não revestida separada. As amostras e padrões foram diluídos (1:10) nas cavidades com matriz de soro a 10% a um volume de 75 μL e misturadas com o mesmo volume de TCZ-DIG, iniciando o período de pré-incubação de uma hora. Os SA-MTPs revestidos com TCZ-Bi foram carregados com as

soluções de pré-incubação por transferir 100 µL de cada cavidade da placa de pré-incubação para as cavidades do MTP revestido e incubadas em um agitador a 400 rpm por uma hora. Após lavagem, conjugado de peroxidase de rábano anti-Dig policlonal (HRP) em um volume de 100 µL (100 mU/mL) foi adicionado às cavidades e incubado em um agitador por uma hora. Após lavagem a reação de geração de cor catalisada por HRP foi iniciada por adicionar 100 µL de solução de ABTS. Quando a densidade ótica máxima (OD) era aproximadamente 2,0, normalmente em 20 a 30 minutos, o sinal da reação de cor foi medido por uma leitora ELISA em um comprimento de onda de 405 nm (referência, 490 nm). O mesmo ensaio foi realizado na presença dos reagentes de confirmação, com medição simultânea sem os reagentes de confirmação. Os dados OD obtidos foram usados para gerar a curva de calibragem padrão por ajuste de curva de regressão de 4 parâmetros não linear de acordo com o método Wiemer-Rodbard para calcular a concentração de amostra.

[000167] Os pontos de corte para os resultados de teste foram ajustados nas Cis a 95% dos sinais de ensaio (OD) a partir de múltiplas análises de amostras de soro de modelo humano a partir de voluntários saudáveis e pacientes com RA. Um resultado de teste de triagem foi considerado positivo em um valor acima de corte. Uma diminuição em absorvência de >20% em relação à amostra não reforçada indicou um resultado positivo. O corte de triagem foi determinado a 61,4 ng/mL de anticorpo de referência. A precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram 84,8% a 93,1% e 91,3% a 92,2%, respectivamente. Os valores correspondentes para precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram 1,8% a 2,0% e 6,8% a 8,0%. A precisão de ELISA foi definida pela extensão na qual os resultados do ensaio acordaram com os

valores verdadeiros. A precisão foi determinada por comparar concentrações medidas do padrão de controle positivo anti-TCZ policlonal de coelho reforçado em soro humano com concentrações nominais de anti-TCZ. Padrões de controle positivo com concentrações elevadas (360 ng equivalentes/mL) e baixa concentração (60 ng equivalentes/mL) foram analisados em seis alíquotas de cada padrão de controle positivo medido em duplicata para determinar precisão intra-ensaio e em três alíquotas de cada padrão de controle positivo medido em duplicata para determinar precisão inter-ensaio.

EXEMPLO 1

BIOTINILAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-IL6R TOCILIZUMB

A) Preparação de IgG convencionalmente biotinilado

[000168] O anticorpo anti-IL6R tocilizumab foi dialisado contra tampão (100 mM de tampão de fosfato de potássio (a seguir indicado como K-PO₄), pH 8,5). Posteriormente a solução foi ajustada a uma concentração de proteína de 5 mg/ml. Éster de N-hidroxisuccinimida - ácido aminocapróico-D-biotinoíla foi dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) e adicionado à solução de anticorpo em uma razão molar de 1:5. Após 60 minutos a reação foi parada por adicionar L-lisina. O excesso de reagente de rotulação foi removido por diálise contra 50 mM K-PO₄ suplementado com 150 mM KCl, pH 7.5. Alíquotas de TCZ-Bi foram armazenadas incluindo 6,5% de sacarose a -80°C.

B) Preparação de IgG mono biotinilado

[000169] O anticorpo anti-IL6R tocilizumab foi dialisado contra tampão 100 mM K-PO₄, pH 8,5 e posteriormente a solução foi ajustada a uma concentração de proteína de 5 mg/ml. Éster de N-hidroxisuccinimida - ácido

aminocapróico-D-biotinoíla foi dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) e adicionado à solução de anticorpo em uma razão molar de 1:1. Após 60 minutos a reação foi parada por adicionar L-lisina. O excesso de reagente de rotulação foi removido por diálise contra 25 mM K-PO4 suplementado com 150 mM KCl, pH 7.2. A mistura foi transferida para um tampão com 100 mM K-PO4, 150 mM KCl, pH 7,2 incluindo 1 M de sulfato de amônio e aplicada a uma coluna com estreptavidina muteína sefarose. O IgG não biotinilado está no fluxo direto, o IgG mono biotinilado é eluído com 100 mM K-PO4, 150 mM KCl, 1,5% DMSO, pH 7,2 e o IgG biotinilado incluindo populações biotiniladas mais elevadas é eluído com 100 mM K-PO4, 150 mM KCl, 2 mM D-biotina, pH 7,2. O anticorpo mono biotinilado foi dialisado contra 50 mM K-PO4 suplementado com 150 mM KCl, pH 7,5. As alíquotas foram armazenadas incluindo 6,5% de sacarose a -80°C.

[000170] Exemplo 2

[000171] Digoxigenilação de anticorpo anti-IL6R tocilizumab

[000172] A) Preparação de IgG convencionalmente digoxigenilado

[000173] O anticorpo anti-IL6R tocilizumab foi dialisado contra tampão (100 mM de tampão de fosfato de potássio (a seguir indicado como K-PO4), pH 8,5). Posteriormente a solução foi ajustada a uma concentração de proteína de 5 mg/ml. Éster de N-hidroxisuccinimida - ácido aminocapróico-ε-3-O-metilcarbonil- de digoxigenina foi dissolvido em DMSO e adicionado à solução de anticorpo em uma razão molar de 1:4. Após 60 minutos a reação foi parada por adicionar L-lisina. O excesso de reagente de rotulação foi removido por diálise contra 50 mM K-PO4 suplementado com 150 mM KCl, pH 7.5. TCZ digoxigenilado (TCZ-Dig) foi armazenado em alíquotas incluindo 6,5% de sacarose a -80°C.

B) Preparação de IgG mono digoxigenilado

[000174] O anticorpo anti-IL6R tocilizumab foi dialisado contra tampão 100 mM K-PO₄, pH 8,5 e posteriormente a solução foi ajustada a uma concentração de proteína de 5 mg/ml. Éster de N-hidroxisuccinimida - ácido aminocapróico-ε-3-O-metilcarbonila de digoxigenina foi dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) e adicionado à solução de anticorpo em uma razão molar de 1:1. Após 60 minutos a reação foi parada por adicionar L-lisina. O excesso de reagente de rotulação foi removido por diálise contra 50 mM K-PO₄ suplementado com 150 mM KCl, pH 7.5. A mistura foi aplicada a uma coluna de sefarose com anticorpos monoclonais imobilizados contra digoxigenina. O anticorpo não digoxigenilado está no fluxo direto, o IgG mono digoxigenilado é eluído com tampão de eluição suave (Thermo Scientific, no. 21013) e o anticorpo digoxigenilado incluindo populações digoxigeniladas mais elevadas é eluído com 1 M ácido propiônico. A fração com anticorpo mono digoxigenilado foi dialisada primeiramente contra 20 mM TRIS, 20 mM NaCl, pH 7,5 e em segundo lugar contra 50 mM K-PO₄, 150 mM KCl, pH 7,5. As alíquotas foram armazenadas incluindo 6,5% de sacarose a -80°C.

Exemplo 3

Geração de IgG humano em forma oligomérica

[000175] IgG humano purificado de soro humano por cromatografia de permuta de íons foi dialisado contra 150 mM de tampão de fosfato de potássio contendo 100 mM NaCl, pH 8,4, e a solução de proteína foi concentrada a uma concentração de proteína de 50 mg/ml. Suberato de disuccinimidil (DSS) foi dissolvido em DMSO e adicionado à solução de anticorpo em uma razão molar de 1:6 (IgG:DSS). A

mistura foi incubada a 25°C e pH 8,4, com agitação e a reação foi analisada com uma coluna de filtração de gel analítico (por exemplo, usando uma coluna TSK 4000). A polimerização foi parada após 140 min. por adicionar lisina a uma concentração final de 20 mM. Após 45 min. de incubação a 25°C o IgG humano oligomérico foi separado por filtração de gel (por exemplo, utilizando uma coluna Sephacryl S400) para remover frações moleculares baixas. A composição dos oligômeros foi caracterizada por espectroscopia UV, cromatografia de exclusão de tamanho e eletroforese de gel SDS-PAGE. O IgG humano oligomérico foi formado em alíquotas (10,5 mg/mL) e armazenado a -65°C até ser recentemente diluído com tampão Universal (no. Cat. 4742672) a uma concentração de 55,6 µg/mL para uso como aditivo de ensaio ADA (AAA) no imunoensaio.

Exemplo 4

Preparação de padrões de calibragem e amostras de controle de qualidade

[000176] Soluções de material para padrões de calibração (CS) e amostras de controle de qualidade (QC) foram preparadas separadamente. As amostras CS foram recentemente preparadas no dia do ensaio utilizando uma solução de material de 0,5 mg/mL de TCZ. Após pré-diluição com soro agrupado humano (HPS), a solução de trabalho CS resultante foi diluída 1:1 em etapas com 100% de HPS para fornecer concentrações de calibrador de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3; e 15,6 ng/mL antes do uso no ensaio. O controle negativo foi 100% HPS. Para a etapa de pré-incubação no ensaio, as amostras de CS foram diluídas 1:10 para ajustar em uma concentração de soro de 10% e uma faixa de concentração de ensaio de 100 ng/mL a 1,56 ng/mL.

[000177] As amostras de material de QC usadas foram feitas em soro agrupado humano a 100% e armazenadas

como alíquotas de uso único a -20°C . Três amostras de QC separadas foram preparadas e armazenadas em concentrações de material representando concentrações de soro não diluído elevada (750 ng/mL), média (400 ng/mL) e baixa (50 ng/mL). Para a etapa de pré-incubação no ensaio as amostras QC foram recentemente diluídas 1:1) na solução de detecção/captura para atingir uma concentração de soro de 10%. Uma quarta amostra QC no ponto de corte típico do ensaio a 25 ng/mL foi adicionalmente usada.

Exemplo 5

Ensaio de triagem e confirmação de ADA

[000178] Um ELISA de encaixe foi usado para triagem e confirmação de anticorpos anti-fármaco (ADAs) contra tocilizumab (TCZ) (vide Stubenrauch, K., e outros, Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609). O princípio do método é a captura de ADAs no complexo com TCZ-Dig e TCZ-Bi, o último levando à imobilização sobre uma placa revestida com estreptavidina. O complexo de TCZ-Bi/ADA/TCZ-Dig ligado a SA-MTP foi detectado por um anticorpo conjugado de enzima anti-Dig-HRP. O princípio do ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante fármaco é mostrado na figura 1. A inclusão de IgG oligomérico como aditivo de ensaio ADA leva a um ensaio de anticorpo anti-fármaco com interferência suprimida como mostrado na figura 2. O peroxidase de rábano (HRP) do anticorpo policlonal catalisa uma reação de cor do substrato ABTS. A intensidade de cor é proporcional à concentração do analisado.

[000179] O ensaio de triagem foi realizado em temperatura ambiente. Reagentes e amostras de soro foram diluídas com tampão Universal (cat. No. 4742672), todas as etapas de lavagem foram realizadas com o tampão de lavagem (PBS, 0,05% de polisorbato 20 (Tween 20) (no. Do cat. 11332465-001)) três vezes com 300 μL por cavidade.

Incubações foram realizadas sob agitação em um agitador de placa de microtítulo (agitador MTP) a 500 rpm. Amostras de teste, amostras QC e CS foram incubadas durante a noite (até 16 horas) com o anticorpo de captura TCZ-Bi e o anticorpo de detecção TCZ-Dig. Cada cavidade da placa de microtítulo pré-incubação (MTP) foi carregada com 225 µL da solução de detecção/captura contendo 1,667 µg/mL TCZ-Bi e 1,667 µg/mL de TCZ-Dig com aditivo de ensaio ADA (AAA) de IgG humano oligomérico e posteriormente 25 µL das amostras respectivas foram adicionadas. As concentrações resultantes de TCZ-Bi e TCZ-Dig foram 1,5 µg/mL cada e o IgG humano oligomérico tinha uma concentração de 50 µg/mL. O MTP carregado foi coberto para evitar evaporação e incubado durante a noite. Duplicatas de 100 µL de cada cavidade da placa de pré-incubação foram transferidas para as cavidades de uma placa de microtítulo revestida com estreptavidina (SA-MTP) que foi coberta e incubada por 1 h.

[000180] Após lavagem, o conjugado anti-Dig Fab-HRP policlonal com uma concentração de 25 mU/mL foi adicionado em um volume de 100 µL a cada cavidade e incubada por 1 h. após lavagem, a solução pronta para uso ABTS foi adicionada em alíquotas de 100 µL a cada cavidade e incubadas por aproximadamente 10 a 15 min. enquanto agita. O sinal da reação de geração de cor foi medido por uma leitora ELISA a 405 nm de comprimento de onda (comprimento de onda de referência: 490 nm). Valores de absorvência de cada amostra de soro foram determinados em triplicatas. O padrão mais elevado deve atingir uma densidade ótica (OD) entre 1,8 e 2,2 unidades arbitrárias (AU). Os dados OD obtidos foram usados para gerar a curva de calibragem padrão por ajuste de 4 parâmetros não lineares "Wiener Rodbard" para calcular a concentração de

amostra. Uma amostra foi confirmada como positiva para ADAs se a recuperação da concentração foi menor que o ponto de corte de especificidade.

[000181] A avaliação do ponto de corte de especificidade foi realizado por análise de 32 amostras de soro humano de modelo individuais de pacientes com artrite reumatoide em duplicatas em um MTP. O ponto de corte especifica o sinal acima do qual uma amostra é definida como potencialmente positivo para a presença de ADAs no ensaio de triagem de ADA. Devido a não normalidade dos dados, uma abordagem não paramétrica com um percentil de 95% foi aplicado para cálculo de ponto de corte com base na média de pontos de corte em placas replicadas.

[000182] Os experimentos conduzidos para determinar o ponto de corte do ensaio ADA a partir de medições duplicatas de 32 amostras de soro de modelo humano individuais de pacientes com artrite reumatoide revelaram uma AU média de aproximadamente 0,026 em três placas diferentes com um desvio padrão (SD) de aproximadamente 0,009. O coeficiente de variação correspondente (CV) foi 23,8%; 20,0% e 19,0%, respectivamente. Com base nesses conjuntos de dados, um fator de normalização de $NF = 1.6905$ foi derivado que foi usado por todo a qualificação de ensaio e aplicado a pontos de corte específicos de placa (ponto de corte específico de placa [AU] = sinal [AU] (controle negativo) X NF).

[000183] Para qualificação do ensaio ADA de triagem, cinco preparações de curva de calibragem independentes com sete amostras de calibrador com uma faixa de concentração de ensaio de 1,56 ng/mL a 100 ng/mL e uma amostra de modelo foram medidos em duplicatas em uma placa. Os cursos de qualificação intra-ensaio foram realizados com cinco réplicas (cinco frascos separados) com cada das

quatro amostras QC medidas em duplicatas em uma placa única. Dados de qualificação inter-ensaio para todas as amostras QC medidas em duplicatas foram obtidos a partir de sete cursos de teste independentes realizados por pelo menos dois operadores em quatro dias diferentes.

[000184] Uma curva de calibragem típica do ELISA com interferência suprimida é mostrado na figura 3. A precisão de medições duplicatas de amostras foi avaliada durante os experimentos de qualificação e seu CV não excedeu 15%. Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e valores de precisão do ELISA DE ADA com interferência suprimida são resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Determinação de precisão intra-ensaio e inter-ensaio e precisão do ELISA com interferência suprimida utilizando ADAs específicas de tocilizumab reforçadas em soro humano.

	Concentração de ADA em 100 % de soro [ng/mL]					
	Intra-ensaio (n=5)			Inter-ensaio (n=7)		
	QC elevado	QC médio	QC baixo	QC elevado	QC médio	QC baixo
reforçado (concentração esperada)	750	400	50	750	400	50
Média de concentração medida	683	382	50.8	696	402	52.5
SD de concentração medida	15.6	15.8	1.33	21.2	13.6	2.8
precisão (% CV)	2.28	4.14	2.62	3.04	3.38	5.33

exatidão (% de recuperação)	91.1	95.5	102	92.8	101	105
-----------------------------	------	------	-----	------	-----	-----

[000185] A precisão intra-ensaio determinada foi <5% para todos os QCs incluindo o ponto de corte QC de 25 ng/mL. A precisão intra-ensaio determinada estava na faixa de 91,1% a 102% e todas as amostras QC de ponto de corte testadas positivas. A precisão inter-ensaio para QCs com cálculo retroativo foi 6% para todos os QCs. A precisão Inter-ensaio determinada era 92,8% a 105% para os QCs elevado, médio e baixo. Todas as medições QC de ponto de corte forneceram positividade de ADA.

[000186] Um efeito de gancho de dose elevada potencial foi avaliado por titulação serial (1:2) de uma amostra de controle positivo em uma faixa de concentração de ensaio de 25.000 ng/mL a 6,1 ng/mL. A recuperação de concentrações de ADA compreendida na faixa de ensaio estava entre 77,9% e 98,9%. Para análise de efeitos de matriz em potencial, 11 amostras de soro humano normal individuais foram reforçadas em QC de dose elevada e baixa, isto é, 50 e 750 ng/mL em 100% de soro, com ADA de controle positivo e foram quantificadas. Além disso, amostras de QC foram também analisadas na mesma placa. A recuperação das concentrações de ADA baixa e elevada era 111% (faixa: 104 a 117%) e 111% (faixa: 107 a 117%), indicando que não houve efeito de matriz no ELISA de ADA com interferência suprimida.

[000187] A tolerância a fármaco foi avaliada por determinar a concentração de TCZ mais elevada na qual uma concentração dada de ADA de controle positivo pode ser detectada acima do ponto de corte. A Tabela 2 apresenta um sumário de um conjunto de dados completo.

Tabela 2: Determinação de tolerância ao fármaco (tocilizumab) no ELISA de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui. Valores de sinal alinhados à esquerda estão acima do ponto de corte específico de placa de 0.045 AU, os valores alinhados à direita estão abaixo do ponto de corte.

	TCZ [$\mu\text{g/mL}$]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ng/mL]	média de sinal [AU]					
10	0.948	2.263	3.266	3.536	3.146	3.272
3	0.310	0.943	1.956	> 3.5	2.860	3.161
1	0.119	0.364	0.789	1.051	1.180	2.292
300	0.055	0.133	0.280	0.376	0.426	0.857
100	0.033	0.057	0.105	0.144	0.163	0.310
30	0.027	0.036	0.051	0.063	0.068	0.113
10	0.022	0.025	0.032	0.039	0.040	0.056
0	0.024	0.023	0.026	0.027	0.027	0.027

[000188] As concentrações do anticorpo anti-IL6R tocilizumab a ser detectado em amostras clínicas são 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ou mais elevada, frequentemente na faixa de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$. Uma concentração de ADA muito baixa de 30 ng/mL foi detectada e testada positiva na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de TCZ. Além disso, concentrações de ADA de 100 ng/mL e 300 ng/mL mostram uma tolerância a fármaco-anticorpo de 30 $\mu\text{g/mL}$ e mesmo 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os mesmos experimentos conduzidos com o ELISA ADA convencional de duas etapas usado anteriormente para tocilizumab revelaram pelo menos tolerância a fármaco 10 vezes mais elevada com o ensaio com interferência suprimida (vide a figura 4 para

300 ng/mL de concentração de ADA).

[000189] A concentração de TCZ a ser usada como o fármaco livre em excesso no ensaio de confirmação foi baseada no conjunto de dados obtido nos experimentos de interferência de fármaco. Para avaliar a concentração de TCZ que pode inibir níveis elevados de ADAs na amostra quatro concentrações diferentes de amostras de controle positivo (1.000; 500; 250; 83,3 ng/mL em 100% de soro) foram individualmente incubadas com concentrações crescentes de TCZ (0; 16; 31; 63; 125; 250 µg/mL em 100% de soro). A concentração de TCZ que inibiu pelo menos 95% (correspondendo a menos de 5% de recuperação de sinal) do sinal medido em concentrações elevadas de ADA de controle positivo foi determinada como sendo 25 µg/mL de TCZ.

[000190] Para reduzir a probabilidade de falso-negativos devido a diferenças de afinidade de ADAs em amostras de estudo durante a fase de teste em estudo posterior, uma concentração de fármaco livre de excesso duas vezes mais elevada do valor determinado foi usada para avaliação adicional, isto é 40 µg/mL de concentração de ensaio correspondendo a 400 µg/mL em 100% de soro.

[000191] O valor de inibição de sinal mínimo necessário para confirmar ADAs específicos foi determinado por pré-incubação de 16 amostras de soro humano de modelo individuais de pacientes com artrite reumatóide com TCZ e analisados em duplicatas em um curso de teste. A análise foi realizada com e sem 400 µg/mL de TCZ livre. Verificou-se que a adição de TCZ livre reduziu o sinal de ensaio por uma média de 14,1% variando de -11,5% a 34,8% e um SD de 11,2%. A aplicação de um intervalo de confiança de 99,9% (média + 3,09 SD) resultou em uma redução mínima de sinal de 49% para amostras de soro de modelo. Com base nesse

cálculo, uma amostra foi avaliada positiva em confirmação se o sinal diminuiu em mais de 49% na presença de fármaco livre de excesso quando comparado com aquele na ausência de fármaco livre. Como amostras de referência, as amostras correspondentes sem TCZ em excesso foram usadas. Para demonstrar a reprodutibilidade de inibição de sinal no ensaio de confirmação, amostras de soro com concentrações de QC positivas elevada, média e baixa foram analisadas três vezes com e sem TCZ em excesso na concentração predefinida.

[000192] O ensaio de ADA com interferência suprimida para TCZ tinha uma faixa de medição de 1.000 ng/mL a 15,6 ng/mL de calibrador de ADA em 100% de soro. Precisão intra-ensaio foi menor que 5% para todos os controles de qualidade e a precisão intra-ensaio era 91,1% a 102%. A precisão e exatidão de inter-ensaio foram menores que 6% e 92,8% a 105%, respectivamente.

[000193] A qualificação do ensaio excluiu um efeito de matriz e gancho.

[000194] Pode ser visto que a tolerância a fármaco do ensaio de ADA com interferência suprimida foi pelo menos 10 vezes mais elevada que aquela da versão anterior.

[000195] O ensaio de confirmação foi realizado essencialmente como descrito anteriormente para o ensaio de triagem exceto que amostras foram analisadas em paralelo sem e com fármaco livre em excesso, isto é, TCZ. A solução de detecção/captura de confirmação continha o mesmo volume da solução de detecção/captura com TCZ em excesso adicional (44,4 µg/mL) para obter uma concentração de ensaio final de 40 µg/mL TCZ após adição das amostras. O cálculo da percentagem de inibição de sinal em condições confirmatórias com fármaco em excesso foi feito utilizando

a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição de sinal} = 100 \times (1 - ([\text{AU}]_{\text{amostra pré-tratada com fármaco}} / [\text{AU}]_{\text{amostra não tratada}})).$$

Exemplo 6

Aplicação do ensaio de ADA com interferência suprimida a amostras clínicas

[000196] Medidas para aumentar a tolerância a fármaco consistindo em 1) aumentar a concentração de TCZ biotinilado e digoxigenilado (por exemplo, até 1,5 µg/mL); 2) incubação simultânea da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig; 3) incubação prolongada da amostra de soro com TCZ-Bi e TCZ-Dig (por exemplo, durante a noite); 4) uso de reagentes de TCZ-Bi e TCZ-Dig apenas acoplados com lisina em vez de uma mistura de reagentes acoplados com carboidrato e lisina; e uso de uma matriz de soro aumentado (por exemplo, 10% em vez de 5%) resultou em um aumento de ADA positivos de 12/28 para 25/28.

[000197] Dezesesseis amostras clínicas de soro foram analisadas por um conjunto de três ensaios ADA diferentes: o ensaio ADA convencional, ensaio ADA com interferência suprimida como relatado aqui sem IgG humano oligomérico adicionado, e o ensaio ADA com interferência suprimida como relatado aqui com a adição de IgG humano oligomérico. Os resultados são resumidos na tabela 6. Das 16 amostras, 15 foram testadas positivas na versão do ensaio ADA em que somente medições 1 a 5 foram tomadas ao passo que somente 8/16 testaram positivas no ensaio ADA convencional bem como no tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui em que medições 1 a 6 foram tomadas, com resultados idênticos em sete das oito amostras. Essas sete amostras com resultados idênticos

foram caracterizadas por baixas concentrações RF nas amostras e/ou na linha de base. Todas as sete amostras continham ADAs do isotipo IgG que se ligaram à parte Fab de tocilizumab indicativa de ADAs específicas de tocilizumab verdadeiras. Três das sete amostras também tinham ADAs de isotipo IgM, porém que também se ligaram à parte Fab. Ao contrário, a grande maioria das amostras restantes tinha ADAs predominantemente do isotipo IgM que se ligou à parte Fc constante de tocilizumab. Essas amostradas também continham uma concentração elevada de RF, isto é, > 1.000 U/mL.

Tabela 6: Análise comparativa de 16 amostras de soro a partir de pacientes com artrite reumatoide tratados com tocilizumab com os formatos diferentes do ensaio ADA, no ensaio de BIAcore e no ensaio de fator reumatoide.

	Ensaio ADA com interferência suprimida como relatado aqui		ensaio ADA convencional	BIAcore: Ligação de isotipo / epítipo de		Ensaio RF [U/ml]	
	no. de amostra	Sem aditivo	Com aditivo			Amostra de estudo	linha de base
				IgG ADA	IgM ADA		
1		+	+	+	IgG / Fab	-	312
2		+	+	+	IgG / Fab	-	324
						324	324

3	+	+	+	IgG / Fab	-	591	324
4	+	+	+	IgG / Fab	-	56	37
5	+	+	+	IgG / Fab	IgG / Fab	117	129
6	+	+	+	IgG / Fab	IgG / Fab	-	47
7	+	+	+	IgG / Fab	-	-	< 15
8	+	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	2,87	1,305
9	-	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	1,79	1,79
10	+	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	1,63	-
11	+	-	-	-	IgG / Fc	2,32	1,393
12	+	-	-	-	IgG / Fc	-	5,51
13	+	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	1,5	1,315
14	+	-	-	-	IgG / Fc; Fab	-	107
15	+	+	-	IgG / Fab; Fc	IgG / Fc	4,45	2,62
16	+	-	+	IgG	-	-	1,099

[000198] O imunoensaio ADA como relatado no exemplo 5 foi usado para analisar 148 amostras de soro diferentes a partir de pacientes com artrite reumatoide

tomadas na linha de base e após administração de tocilizumab. Os resultados da análise com o ensaio ADA com interferência suprimida foram comparados com aqueles obtidos por análise com o imunoensaio ADA convencional. Para análise mais detalhada, um total de 92 amostras de soro (de 148) a partir de 18 pacientes diferentes com informações adicionais no isotipo ADA e região de ligação bem como em eventos clínicos foram selecionados. Pacientes foram selecionados se atenderem pelo menos a um dos seguintes critérios: 1) resposta imune positiva para ADA em qualquer ponto de tempo; 2) concentração de soro TCZ elevada; 3) reação clínica como hipersensibilidade relacionada à infusão ou anafilaxia. A análise da região de ligação e o isotipo dos ADAs foram realizadas com um imunoensaio biossensor como anteriormente descrito (Stubenrauch, K., e outros, Anal. Biochem., 390 (2009) 189-196). Brevemente, a montagem de ensaio de ressonância de plasmon de superfície (SPR) fez uso das quatro células de fluxo paralelas em um chip de biossensor único por imobilização de anticorpo de comprimento total e seus fragmentos constante (Fc) e de ligação de antígeno (Fab) para análise de ligação diferencial de ADAs. Os conjugados padrão de controle positivo simulando ADAs humanos policlonais de isotipos diferentes foram obtidos por conjugar anticorpos de coelho policlonal contra TCZ em imunoglobulina humana (Ig) M, IgG, ou IgE (vide WO 2008/061684). O ensaio de Fator reumatóide (RF) foi realizado no Nefelômetro Siemens BN II utilizando reagentes RF da Siemens Healthcare Diagnostics (Neward, DE, EUA). Brevemente, partículas de poliestireno revestidas com um complexo imune consistindo em imunoglobulina humana e IgG anti-humano de carneiro são agregados quando misturados com amostras contendo RF. Esses agregados espalham um feixe de

luz passada através da amostra. A intensidade da luz espalhada é proporcional à concentração da proteína respectiva na amostra. O resultado é avaliado por comparação com um padrão de concentração conhecida.

[000199] A avaliação comparativa de 258 amostras de soro diferentes a partir de pacientes RA tratados com TCZ com o ensaio ADA tolerante a fármaco com interferência suprimida e convencional como relatado aqui mostrou os mesmos resultados positivos em 12 amostras. O ensaio convencional mediu 27 pacientes de placebo positivos ao passo que o ensaio ADA tolerante a fármaco com interferência suprimida como relatado aqui 4. Em conclusão, o conjunto de medidas como descrito aqui e a adição de IgG humano oligomérico como um aditivo de ensaio de ADA conferiu tolerância aumentada de fármaco e interferência suprimida por RF em comparação com o ensaio ADA convencional.

[000200] Uma análise de subconjunto de dados acima mencionados é mostrada na tabela 7 abaixo.

Tabela 7

Paciente	Ponto de tempo	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida		dosagem
P1	semana 4	+	0.812	+	0.110	placebo
P2	linha de base	+	1.009	+	0.893	4 mg/kg
P2	semana 4	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	semana 9	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P3	semana 8	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P3	semana 24	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	semana 28	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P4	semana 4	+	1.409	+	0.242	4 mg/kg
P5	semana 28	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	semana 8	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P6	semana 12	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg

P6	semana 24	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P7	semana 4	+	0.771	+	0.058	placebo

[000201] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida); +: resultado de ELISA positivo; -: resultado de ELISA negativo

[000202] Na tabela 8a sinais de ensaio para 27 pacientes de placebo não tratados com TCZ são mostrados como barras e números. Devido à ausência de ADA induzida por tratamento com TCZ, sinais de ensaio elevado nesse grupo não são esperados e indicariam uma interferência potencial.

Tabela 8a

Paciente	Ponto de tempo	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida		dosagem
P8	linha de base	+	0.270	-	0.032	placebo
P8	semana 4	+	0.231	-	0.033	placebo
P9	semana 8	+	3.736	-	0.055	placebo
P9	linha de base	+	3.297	+	0.058	placebo
P9	semana 12	+	2.863	-	0.046	placebo
P9	semana 4	+	3.739	-	0.052	placebo
P1	semana 4	+	0.812	+	0.110	placebo
P10	semana 4	+	0.755	-	0.021	placebo
P10	semana 4	+	0.635	-	0.021	placebo
P11	linha de base	+	0.272	-	0.020	placebo
P11	semana 4	+	0.271	-	0.021	placebo
P11	semana 4	+	0.234	-	0.020	placebo
P12	linha de base	+	1.157	-	0.027	placebo
P12	linha de base	+	1.362	-	0.028	placebo
P12	semana 4	+	1.149	-	0.029	placebo

P4	linha de base	+	0.522	-	0.033	placebo
P4	semana 4	+	1.409	+	0.242	placebo
P4	semana 4	+	0.651	-	0.047	placebo
P13	semana 36	+	0.349	-	0.023	placebo
P14	semana 4	+	0.245	-	0.033	placebo
P14	linha de base	+	0.276	-	0.035	placebo
P14	semana 4	+	0.275	-	0.037	placebo
P15	semana 4	+	0.580	-	0.049	placebo
P7	linha de base	+	0.990	-	0.056	placebo
P7	semana 4	+	0.822	-	0.052	placebo
P7	semana 4	+	0.523	-	0.042	placebo
P7	semana 4	+	0.771	+	0.058	placebo

[000203] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida); +: resultado ELISA positivo; -: resultado ELISA negativo.

[000204] O padrão de sinal dos dois ensaios é muito diferente: ao passo que todas as 27 amostras de placebo foram determinadas como sendo positivas utilizando o ELISA convencional, somente 4 das 27 amostras foram determinadas como sendo positivas com o ELISA de interferência suprimida como relatado aqui.

[000205] Além de pacientes tratados com placebo amostras de pacientes tratados com TCZ foram analisadas. Na tabela 8b os resultados para os pacientes antes do tratamento TCZ são mostrados. Na Tabela 8c os resultados para pacientes tratados com TCZ são mostrados.

Tabela 8b

Paciente	Ponto de tempo	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida		dosagem
P2	linha de base	+	1.009	+	0.893	4

P16	linha de base	+	0.745	-	0.021	8
P17	linha de base	+	0.281	-	0.020	8
P18	linha de base	+	1.401	-	0.023	4

[000206] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida);
+: resultado de ELISA positivo; -: resultado de ELISA negativo

[000207] Tabela 8c

[0001] Paciente	Ponto de tempo	ELISA convencional		ELISA com interferência suprimida		dosagem
P19	semana 24	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	semana 24	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	semana 4	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	semana 8	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	semana 4	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	semana 8	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	semana 24	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	semana 4	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	semana 4	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	semana 24	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	semana 28	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	semana 4	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg

P3	semana 8	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	semana 8	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	semana 4	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	semana 12	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	semana 24	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	semana 4	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg
P17	semana 4	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg
P17	semana 8	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
P18	semana 4	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg
P18	semana 4	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
P5	semana 28	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	semana 12	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	semana 24	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P6	semana 8	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P22	semana24	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

[000208] CP relacionado a estudo: 0.215 (ELISA convencional); 0.058 (ELISA com interferência suprimida); +: resultado de ELISA positivo; -: resultado de ELISA negativo.

[000209] O padrão de sinal com os dois ensaios não é similar: ao passo que 25 pacientes foram determinados como sendo positivos utilizando o ELISA convencional

somente 10 pacientes foram determinados como sendo positivos utilizando o ELISA com interferência suprimida como relatado aqui.

EXEMPLO 7

Influência de tipo de derivatização de reagentes marcadores e de captura

Mono- vs. Multi-rotulação

[000210] Medidas para aumentar a tolerância a fármaco consistindo em aumentar a concentração de TCZ biotinilado e digoxigenilado (por exemplo, até 1,5 µg/mL); isso poderia causar segundo plano mais elevado por digoxigenina aderente; para cuidar de tolerância pior a fármaco devido a pontos de corte mais elevados, uma mono biotinilação e mono digoxigenilação fornece sinais de segundo plano mais baixos pela presença de concentração de marcador e captura mais elevada.

[000211] Um ELISA de encaixe foi usado para triagem e confirmação de anticorpos anti-fármaco (ADAs) contra tocilizumab (TCZ) (vide Stubenrauch, K., e outros, Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609). O princípio do método é a captura de ADAs no complexo com TCZ-Dig(mono) e TCZ-Bi(mono), o último levando à imobilização sobre uma placa revestida com estreptavidina. O complexo de TCZ-Bi/ADA/TCZ-Dig (pré-incubação durante a noite) ligado a SA-MTP foi detectado por um anticorpo conjugado de enzima anti-Dig-HRP. O princípio do ensaio de anticorpo anti-fármaco tolerante a fármaco é mostrado na figura 1. A inclusão de IgG oligomérico como aditivo de ensaio ADA leva a um ensaio de anticorpo anti-fármaco com interferência suprimida como mostrado na figura 2. O peroxidase de rábano (HRP) do anticorpo policlonal catalisa uma reação de cor do substrato ABTS. A intensidade de cor é proporcional à concentração do analisado.

[000212] O ensaio de triagem foi realizado em temperatura ambiente. Reagentes e amostras de soro foram diluídas com tampão Universal (cat. No. 4742672), todas as etapas de lavagem foram realizadas com o tampão de lavagem (PBS, 0,05% de polisorbato 20 (Tween 20) (no. Do cat. 11332465-001)) três vezes com 300 µL por cavidade. Incubações foram realizadas sob agitação em um agitador de placa de microtítulo (agitador MTP) a 500 rpm. Amostras de teste, amostras QC e CS foram incubadas durante a noite (16 horas) com o anticorpo de captura TCZ-Bi e o anticorpo de detecção TCZ-Dig. Cada cavidade da placa de microtítulo pré-incubação (MTP) foi carregada com 225 µL da solução de detecção/captura contendo 1,667 µg/mL TCZ-Bi(mono) e 1,667 µg/mL de TCZ-Dig(mono) com aditivo de ensaio ADA (AAA) de IgG humano oligomérico e posteriormente 25 µL das amostras respectivas foram adicionadas. As concentrações resultantes de TCZ-Bi(mono) e TCZ-Dig(mono) foram 1,5 µg/mL cada e o IgG humano oligomérico tinha uma concentração de 50 µg/mL. O MTP carregado foi coberto para evitar evaporação e incubado durante a noite. Duplicatas de 100 µL de cada cavidade da placa de pré-incubação foram transferidas para as cavidades de uma placa de microtítulo revestida com estreptavidina (SA-MTP) que foi coberta e incubada por 1 h.

[000213] Após lavagem, o conjugado anti-Dig Fab-HRP policlonal com uma concentração de 25 mU/mL foi adicionado em um volume de 100 µL a cada cavidade e incubada por 1 h. após lavagem, a solução pronta para uso ABTS foi adicionada em alíquotas de 100 µL a cada cavidade e incubadas por aproximadamente 10 a 15 min. enquanto agita. O sinal da reação de geração de cor foi medido por uma leitora ELISA a 405 nm de comprimento de onda

(comprimento de onda de referência: 490 nm). Valores de absorvência de cada amostra de soro foram determinados em triplicatas. O padrão mais elevado deve atingir uma densidade ótica (OD) entre 1,8 e 2,2 unidades arbitrárias (AU). Os dados OD obtidos foram usados para gerar a curva de calibragem padrão por ajuste de 4 parâmetros não lineares "Wiener Rodbard" para calcular a concentração de amostra. Uma amostra foi confirmada como positiva para ADAs se a recuperação da concentração foi menor que o ponto de corte de especificidade.

[000214] Para determinar um ponto de corte 35 soros nativos de pacientes com RD (doença reumática) foram medidos nos dois ensaios. Como mostrado na figura 5 e 6 as variâncias entre os sinais dos soros no ELISA de anticorpo anti-fármaco com interferência suprimida comparado com o ELISA de anticorpo anti-fármaco com interferência suprimida com TCZ-Bi(mono) e TCZ-Dig(mono) são elevados.

[000215] Para avaliação adicional 77 amostras de soros diferentes de pacientes RA tratados com TCZ foram analisados com as duas variantes de ensaio de ADA com interferência suprimida. Como todas as amostras foram tiradas antes do tratamento com TCZ (linha de base), ADA contra TCZ deve estar ausente. Sinais mais elevados que o ponto de corte podem indicar interferência (falso positivos) não relacionada com ADA contra o fármaco de tratamento (TCZ).

[000216] O ensaio com TCZ multirrotulado (figura 7) mostrou mais variação de sinal que o ensaio com TCZ mono rotulado (figura 8). Como pode ser visto essa variação não é uma montagem sistêmica do sistema, que simplesmente seria um deslocamento no eixo Y, porém é um aumento na largura de banda de sinais obtidos. Utilizando esses pontos de corte específicos de ensaio quase todas as amostras no ensaio ADA

tolerante a fármaco com interferência suprimida (mono) estão abaixo do ponto de corte. Na maior parte todas as amostras medidas no multiensaio estão acima do ponto de corte.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de anticorpos anti-fármaco contra um fármaco-anticorpo em uma amostra de um paciente com artrite reumatoide compreendendo um fármaco-anticorpo de captura e um fármaco-anticorpo marcador, **caracterizado** pelo fato de que:

a) o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador têm uma concentração de 0,5 µg/mL ou mais,

b) a amostra é incubada simultaneamente com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador por 0,5 a 24 horas,

c) o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador são, cada um, derivatizados somente uma vez através de um único resíduo de lisina único,

d) a amostra compreende 1% de soro/plasma ou mais,

e) IgG humano oligomérico é adicionado à amostra antes da incubação com o fármaco-anticorpo de captura e o fármaco-anticorpo marcador, e

f) biotina e digoxigenina monoméricas no fármaco-anticorpo de captura e no fármaco-anticorpo marcador.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a amostra compreende anticorpos anti-fármaco e fatores reumatoides.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-inflamatório.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-inflamatório é um anticorpo para o tratamento de artrite reumatoide, ou artrite juvenil, ou osteoartrite, ou doença de Castleman, ou glomerulonefrite proliferativa mesangial.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo

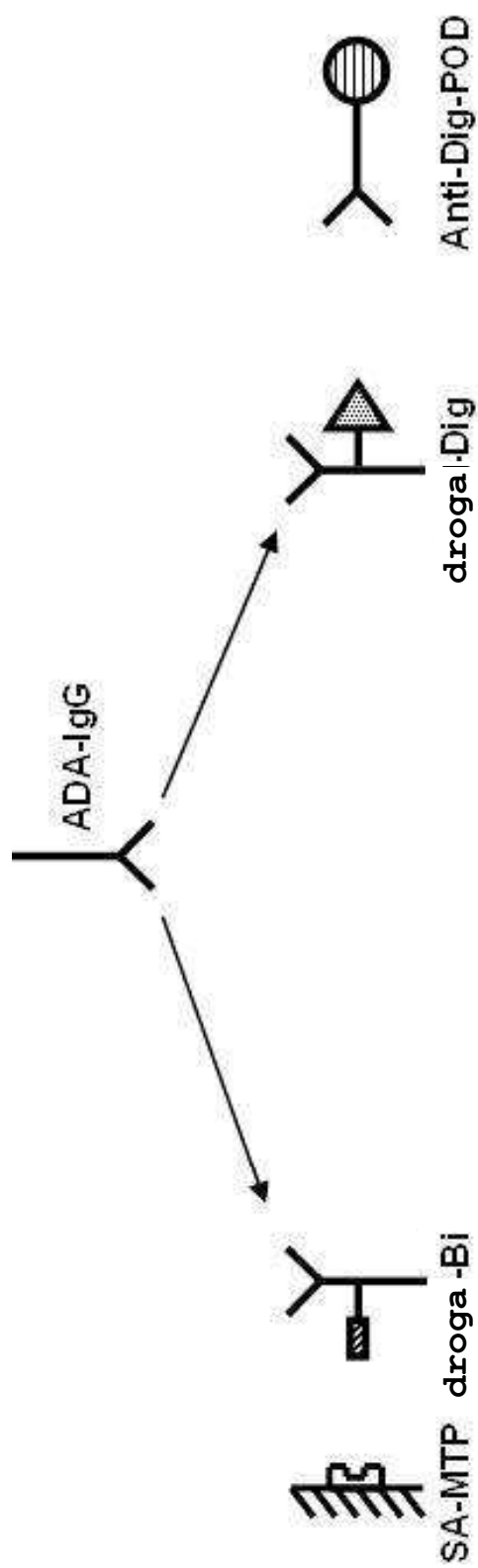
anticâncer.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anticâncer é um anticorpo para o tratamento de mieloma ou plasmacitoma.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-IL6R.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-IL6R é tocilizumab.

Figura 1



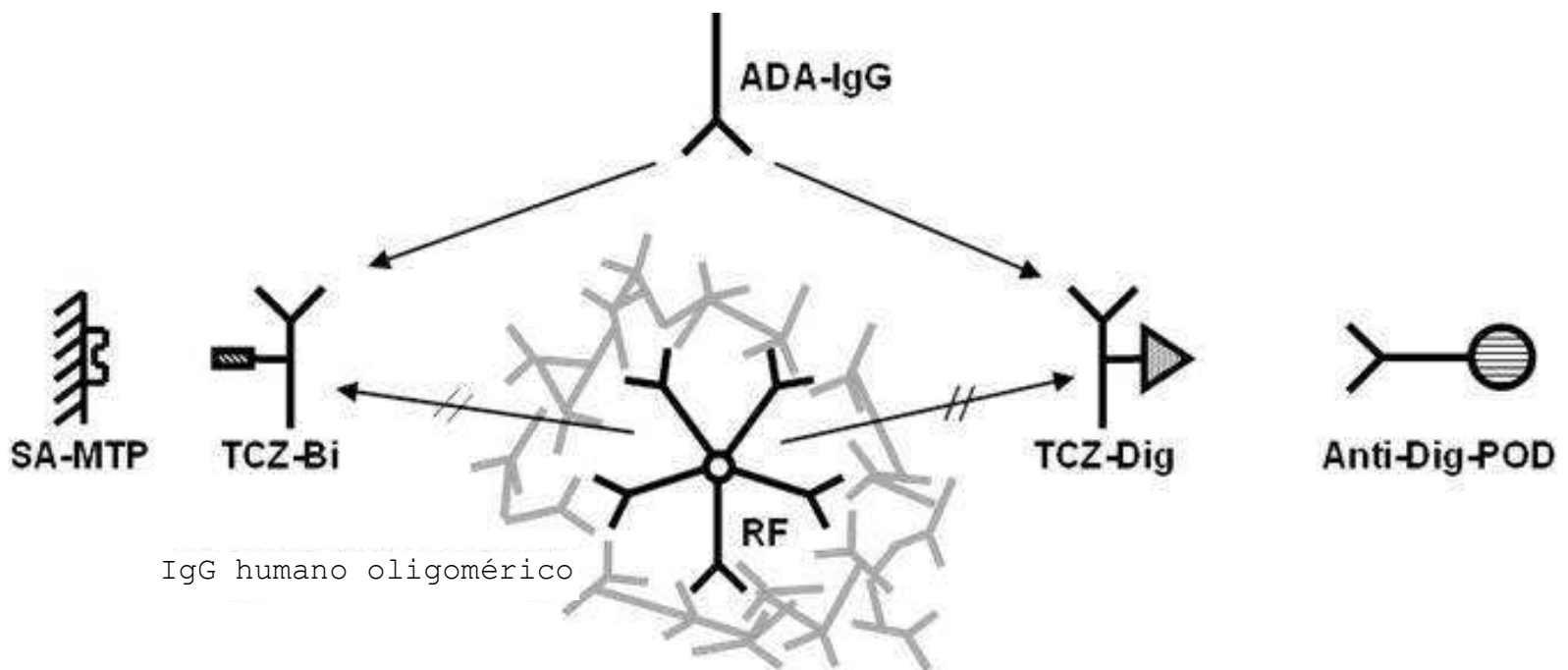


Figura 2

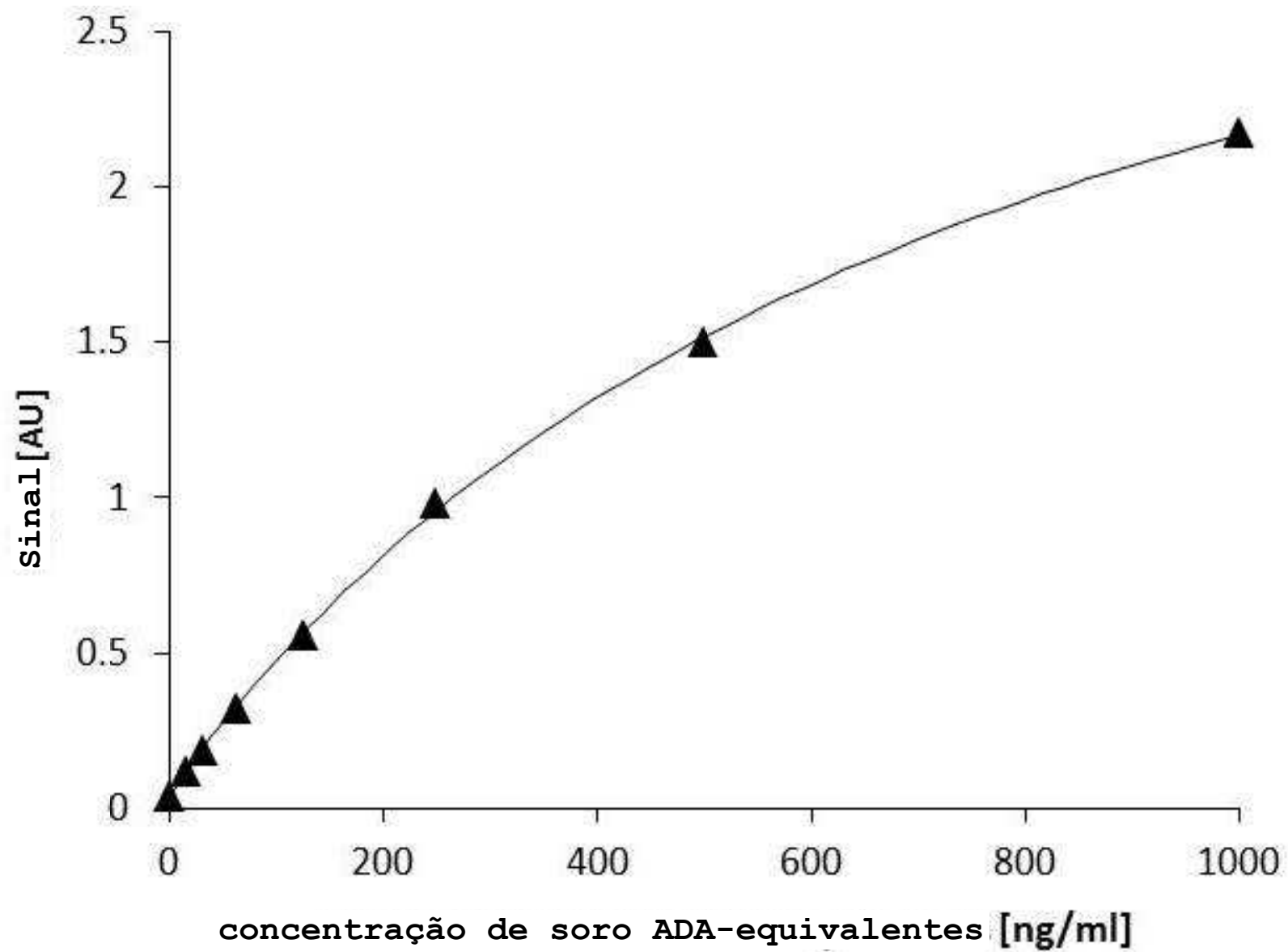


Figura 3

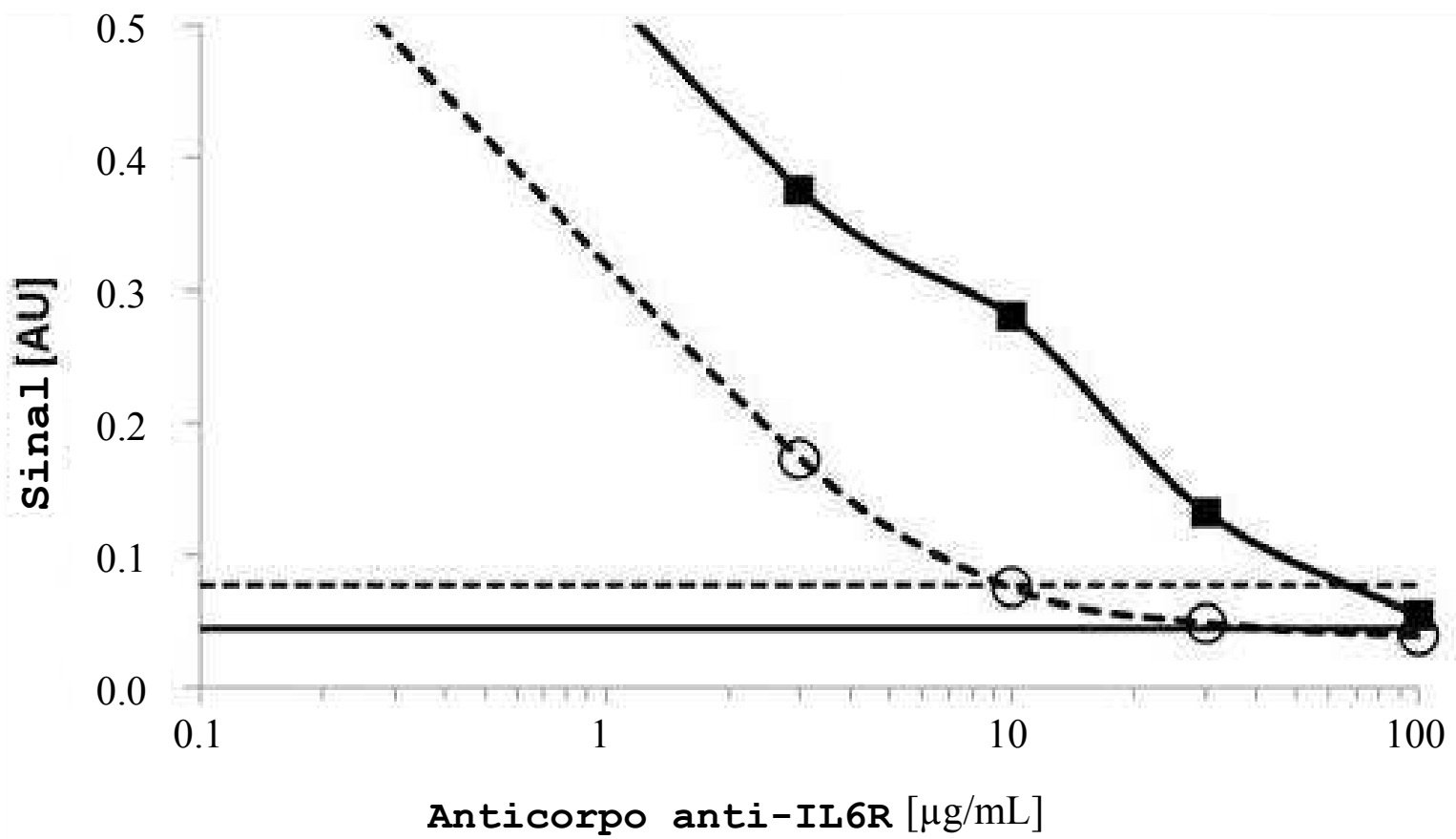
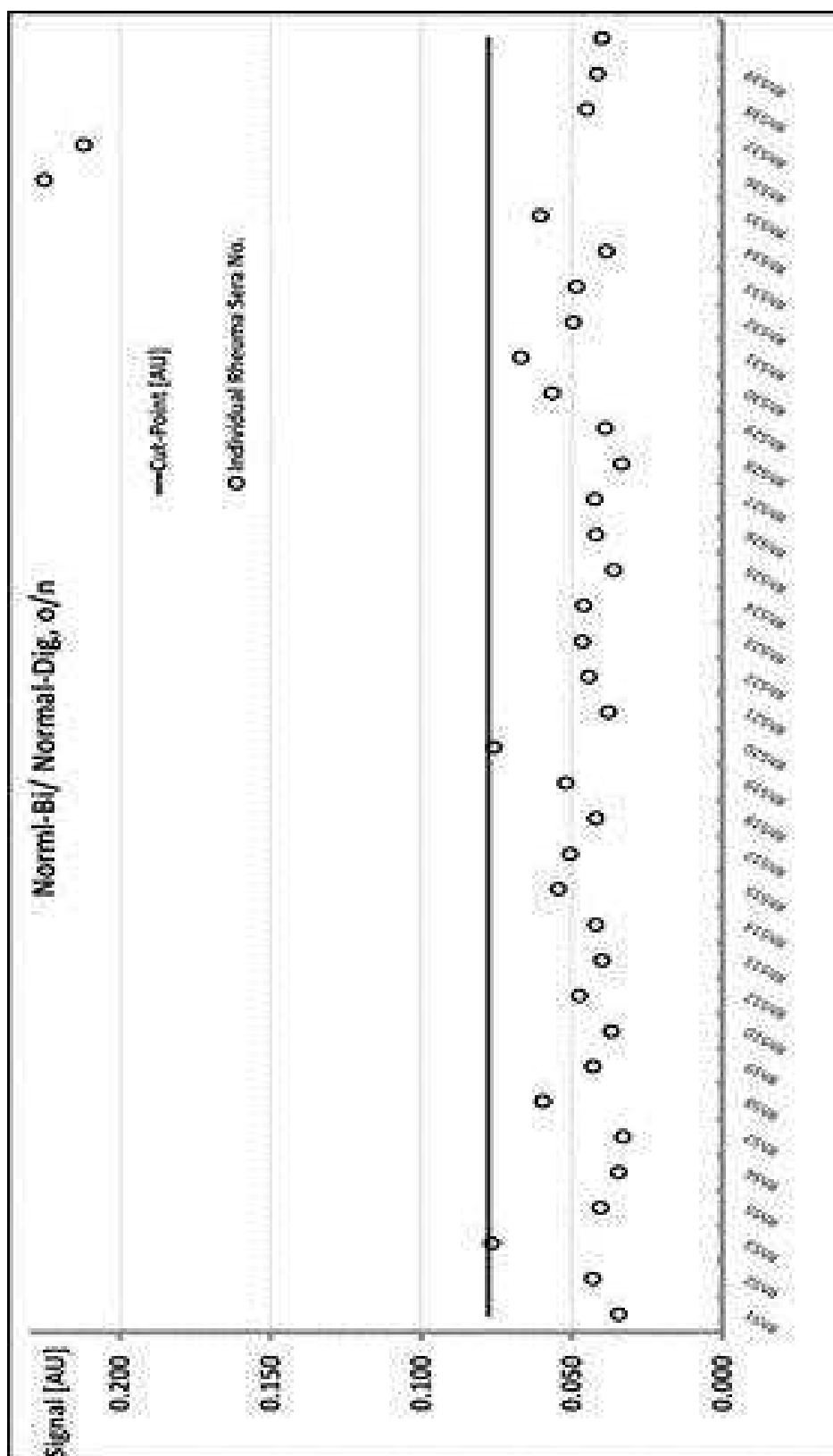
**Figura 4**

Figura 5



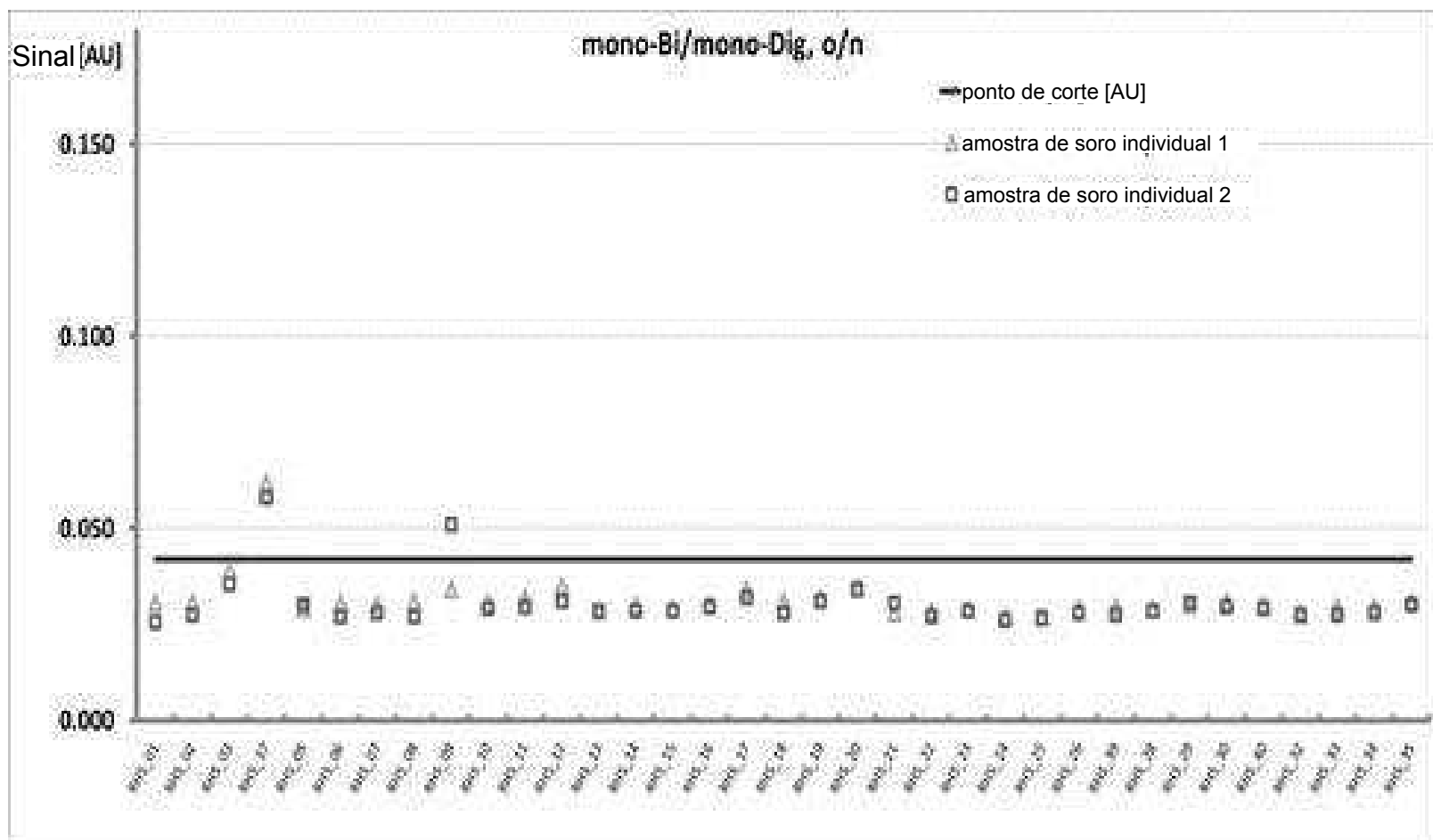


Figura 6

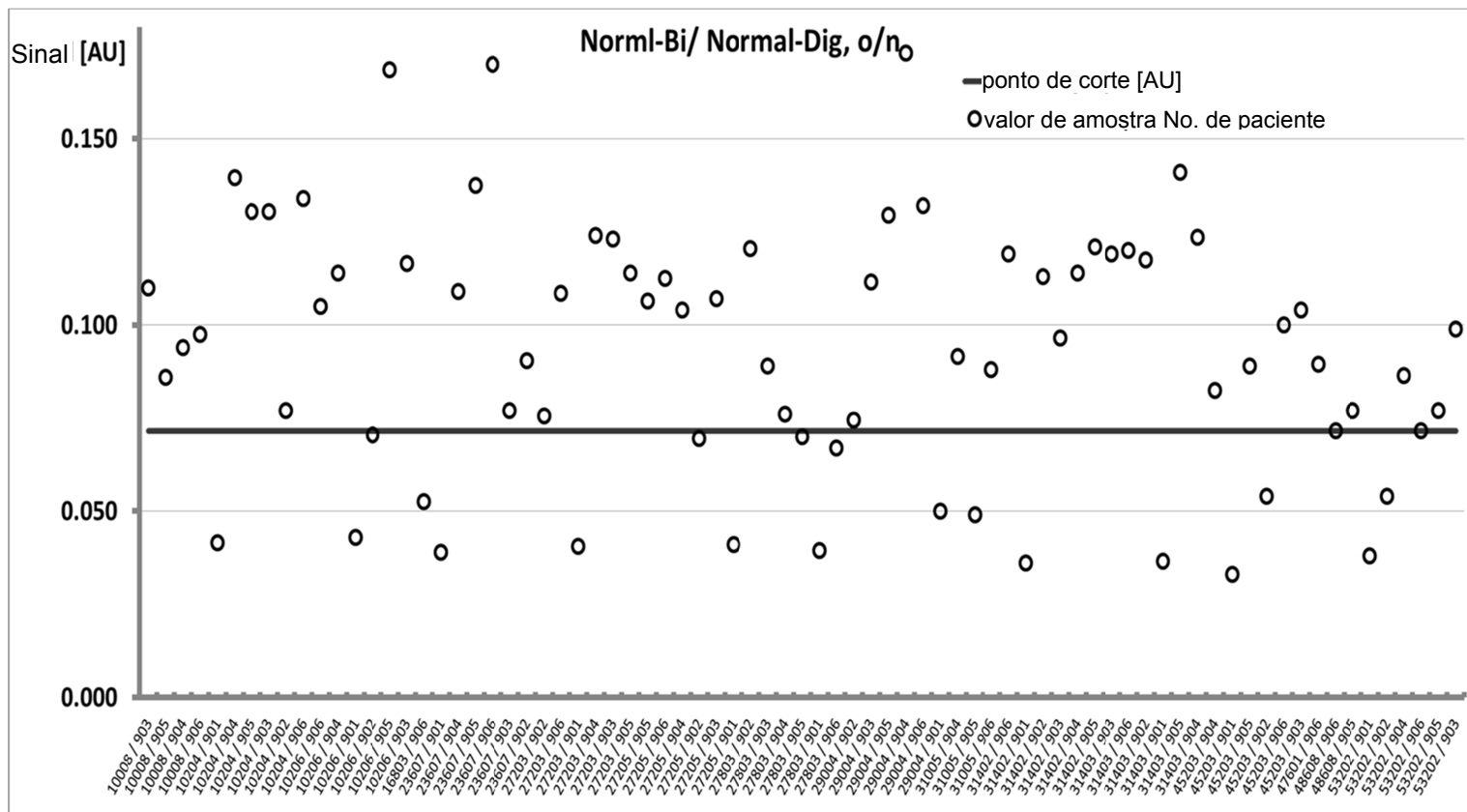


Figura 7

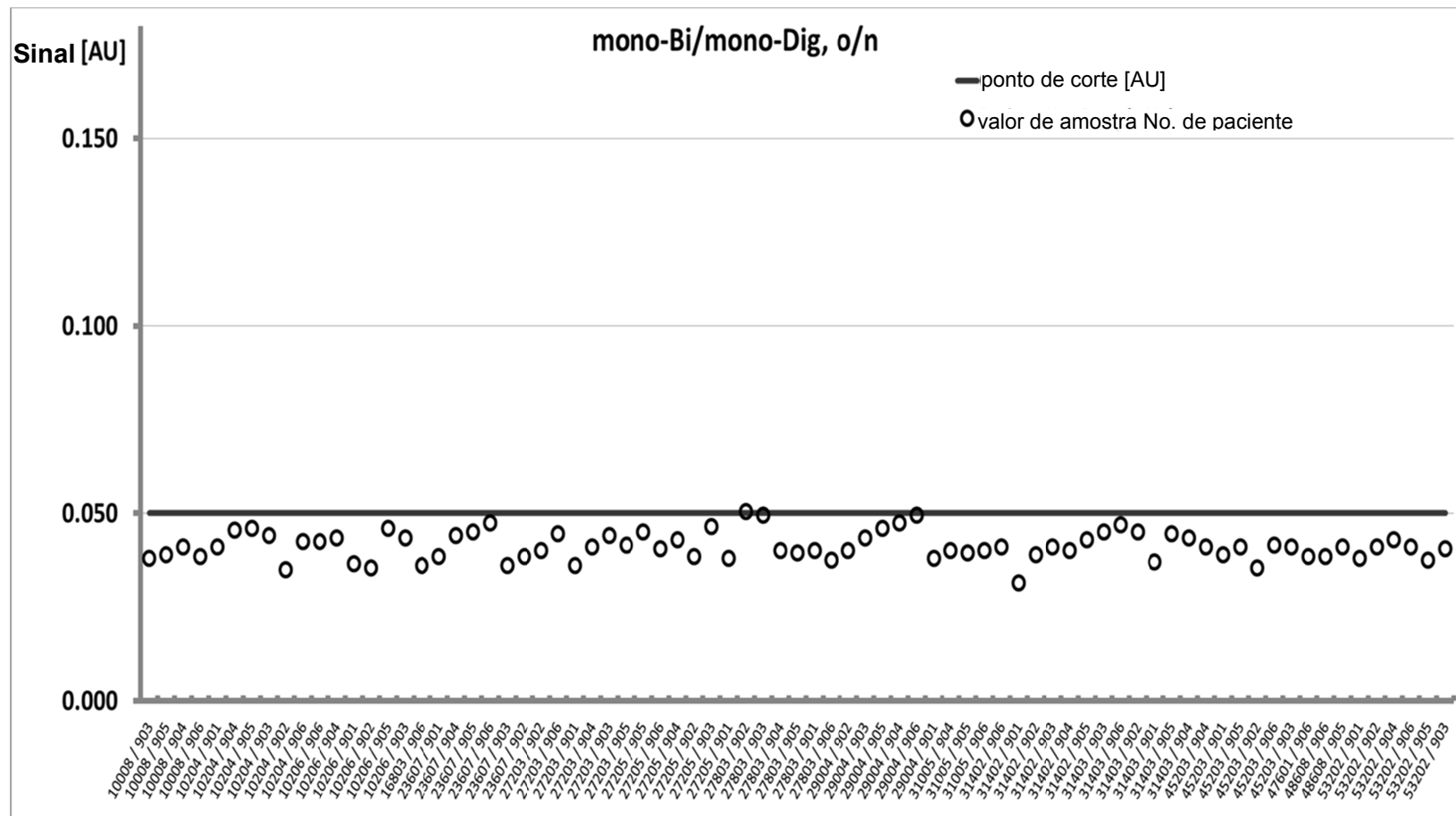


Figura 8