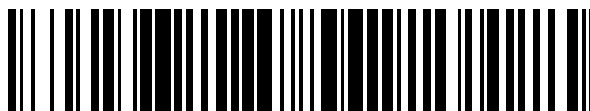


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 828**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09765778 .7**
96 Fecha de presentación: **10.06.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2350668**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2011**

54 Título: **Ensayo de seguridad de fármacos mediante la utilización de pentraxina-3 (PTX-3)**

30 Prioridad:
20.06.2008 EP 08158724

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
KROPSHOFER, Harald;
PLOIX, Corinne y
VOGT, Anne

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

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

ES 2 388 828 T3

DESCRIPCIÓN

Ensayo de seguridad de fármacos mediante la utilización de pentraxina-3 (PTX-3)

5 En el pasado, la administración de anticuerpos terapéuticos ha causado serios efectos secundarios relacionados con la primera infusión de dichos anticuerpos durante los estudios clínicos. Se ha descrito la liberación aguda en la circulación de cantidades excesivas de determinadas citocinas proinflamatorias y se cree que esto es crítico como causa de un compendio de síntomas, lo que se conoce como síndrome de liberación de citocinas (CRS). Habitualmente, el CRS comienza 20-90 min. después de la infusión y resulta de la liberación de citocinas desde las células a las que va dirigido el anticuerpo, así como desde las células inmunológicas efectoras activadas mediante la unión del anticuerpo a los receptores Fc. Cuando las citocinas se liberan en la circulación, pueden aparecer síntomas sistémicos tales como fiebre, náuseas, escalofríos, hipotensión, taquicardia, astenia, cefalea, erupción cutánea, picor en la garganta y disnea. En la mayoría de los pacientes, los síntomas son leves o moderados, con relación a la severidad, y se pueden manejar fácilmente. No obstante, a causa de una liberación masiva de citocinas, algunos pacientes pueden experimentar reacciones severas que son una amenaza para la vida.

Dado que el CRS es un acontecimiento específico de una especie y no se puede observar en modelos animales convencionales para el ensayo de fármacos, se necesitan modelos *in vitro* basados en células derivadas de la sangre humana para evaluar el riesgo de la liberación de citocinas de los nuevos productos medicinales. Se conocen ensayos que miden los niveles de citocinas en el suero del plasma sanguíneo (WingMG et al, Ther Immunol. 1995, 2(4): 183-190). No obstante, el aumento de las citocinas clásicas, tales como el TNF- α , el IFN- γ o las interleucinas, no siempre es predictivo de los casos de CRS. Además, con los ensayos disponibles, se detecta la liberación de citocinas en las muestras de sangre sólo tras un periodo considerable de tiempo después de un potencial evento adverso. De este modo, existe la necesidad de proporcionar un método fiable y más rápido para determinar el riesgo asociado a un compuesto de producir el CRS. Este problema se soluciona mediante la presente invención, en particular, mediante la utilización de pentraxina-3 (PTX-3) para la determinación del riesgo de un compuesto en relación a la inducción de reacciones de infusión relacionadas con la liberación de citocinas.

La presente invención proporciona un nuevo método para la determinación del riesgo de un compuesto de interés de inducir CRS en un individuo.

Dicho método incluye los pasos de:

- a) proporcionar una muestra de sangre total, donde la muestra de sangre se expuso al compuesto, al menos durante 30 minutos.
- b) medir el nivel de pentraxina-3 (PTX-3) en dicha muestra, y
- c) comparar el nivel medido de pentraxina-3 con un control, donde el control es el nivel de pentraxina-3 de una muestra sangre total no expuesta, donde un aumento significativo del nivel de pentraxina-3, en comparación con el control, indica un riesgo para dicho compuesto de inducir un síndrome de liberación de citocinas.

Preferiblemente, el nivel de PTX-3 se mide en el plasma que se obtiene mediante la sustracción de las células sanguíneas de la muestra de sangre total. De manera alternativa, el nivel de PTX-3 también puede medirse en el suero obtenido a partir de una muestra de sangre total.

La inmunogenicidad hace referencia a la habilidad de una sustancia de activar una respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria es una reacción del sistema inmunológico a ciertas sustancias, mediada por las células B, las células T y las células del sistema inmunológico innato, tales como los monocitos, los macrófagos o los granulocitos neutrofilos. Una reacción mediada por las células B involucra la producción y liberación de anticuerpos específicos para un antígeno. Las respuestas de las células T, los monocitos o los granulocitos involucran la liberación de citocinas proinflamatorias y/o antiinflamatorias. Una liberación aguda de cantidades excesivas de ciertas citocinas proinflamatorias en la circulación corporal se denomina "síndrome de liberación de citocinas" (CRS).

Una citocina es una proteína soluble que actúa como mensajero entre las células, ya sea estimulando o inhibiendo la actividad de las diversas células del sistema inmunitario. Las citocinas incluyen linfocinas, monocinas, interleucinas e interferones.

El término "compuesto de interés", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una molécula biológica o química. Una molécula biológica puede ser, en particular, un polipéptido o un polinucleótido. Tales polipéptidos y polinucleótidos pueden tener modificaciones, tales como por ejemplo, metilaciones, pegilaciones, fosforilaciones y glicosilaciones.

El término "polipéptido", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una cadena de aminoácidos conectados mediante enlaces peptídicos. El término "polipéptido" incluye también una proteína y un péptido. Preferiblemente, un

polipéptido es un anticuerpo, más preferiblemente, un anticuerpo terapéutico. Un anticuerpo terapéutico puede ser un anticuerpo humano o humanizado.

5 El término "polinucleótido", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a un polímero de nucleótidos que incluye los nucleótidos A, C, G y T (o U). Un polinucleótido es, por ejemplo, un oligonucleótido, un miRNA, un siRNA, un RNA antisentido, un mRNA o un cDNA.

10 Preferiblemente, un compuesto de interés es un compuesto terapéutico. Un compuesto terapéutico es un compuesto para su utilización en métodos curativos, incluyendo el alivio, la eliminación o la disminución de los síntomas o la prevención o reducción de la posibilidad de contraer cualquier trastorno o malfuncionamiento del cuerpo humano o animal. Un compuesto terapéutico puede ser una molécula biológica o química. Preferiblemente, un compuesto terapéutico biológico es un anticuerpo o un siRNA.

15 La pentraxina-3 (PTX-3), también conocida como pentraxina-3, pertenece a una familia de proteínas conocida como "pentraxinas largas", que se caracterizan por un dominio pentraxina carboxiterminal (Basile et al, J Biol Chem. 1997, 272(13):8172-8). El cDNA que codifica para esta proteína de 381 aminoácidos (SEC. ID N°: 1) se ha clonado por Breviario et al (J Biol Chem., 1992, 267(31): 22190-22197) y se ha identificado como un gen la expresión del cual se induce por IL-1 β en las células endoteliales de la vena umbilical humana.

20 La pentraxina-3 se produce y se secreta en una variedad de tipos celulares. Las células mononucleares sanguíneas periféricas producen la proteína como respuesta a los lipopolisacáridos bacterianos, la IL-1 β , y el TNF- α , pero no como respuesta a IL-6, MCP-1, M-CSF, GM-CSF, o el IFN- γ (Alles et al, Blood. 1994, 84(10):3483-93). La pentraxina se expresa en las células endoteliales, los fibroblastos y los monocitos estimulados (Alles et al, 1994), en las células dendríticas (Doni et al, Eur J Immunol. 2003, 33(10):2886-93), los mioblastos indiferenciados y diferenciados (Introna et al, Blood. 1996, 87(5):1862-72), en los sinoviocitos de la artritis reumatoide (Luchetti et al, Clin Exp Immunol. 2000, 119(1):196-202.), en las células de la glía (Polentarutti et al, J Neuroimmunol. 1 de julio de 2000;106(1-2):87-94), en las células del sarcoma de Kaposi (inducible mediante la IL-6 viral) (Klouché et al, AIDS. 24 de mayo de 2002;16(8):F9-18), macrófagos y células endoteliales e, infrecuentemente, en las células del músculo liso en las placas ateroscleróticas avanzadas (Rolph et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22(5):e10-4), las células mesangiales y endoteliales del glomérulo (Bussolati et al, J Immunol. 1 de febrero de 2003; 170(3):1466-72), preadipocitos (Abderrahim-Ferkoune et al, J Lipid Res. 2003;44(5):994-1000), células del cúmulo oóforo humano y murino (Salustri et al, Development. 2004; 131(7):1577-86) y en neutrófilos (Jaillon et al, JEM. 2007, 204(4):793-804; Imamura et al, Cell Immunol 2007, 248(2):86-94).

35 El término "sangre total" tal y como se utiliza aquí, hace referencia a un fluido que contiene eritrocitos, leucocitos y plaquetas suspendidos en un fluido llamado plasma. Las muestras de sangre total pueden recogerse de cualquier animal. Preferiblemente, la muestra de sangre total se recoge de un paciente humano (muestra de sangre total humana).

40 Existen varios métodos para la exposición de la sangre total a un compuesto de interés:

Método 1) Una posibilidad es la adición del compuesto a una muestra de sangre total. El compuesto se añade tan pronto como sea posible después de que la muestra se recoja, preferiblemente dentro de las 4 horas posteriores a la extracción, más preferiblemente de 0,5 a 3 horas después de la extracción. Lo más preferible, el compuesto se añade en los 30-60 minutos posteriores a la extracción.

50 Existe un periodo de incubación entre la adición del compuesto a la muestra de sangre total y el procesamiento de la muestra. La incubación comienza preferiblemente en las 4 horas posteriores a la extracción de la muestra de sangre. Preferiblemente, la muestra de sangre total se incuba durante, al menos, 30 minutos con el compuesto de interés. Más preferiblemente, el periodo de incubación es de al menos 1 hora, aún más preferible es una incubación de la muestra de sangre total con el compuesto de interés de al menos 2 horas. Preferiblemente, la muestra de sangre total se incuba con el compuesto de interés durante no más de 48 horas, más preferiblemente, no más de 24 horas. Un periodo de incubación preferible es de entre 30 minutos y 24 horas. Un periodo de incubación preferible adicional es de entre 2 h. y 24 horas. Más preferiblemente, el periodo de incubación es de entre 30 minutos y 4 horas.

La incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente (20°C) o superior. Preferiblemente, la muestra se incuba bajo condiciones fisiológicas (temperatura: 35-39°C, preferiblemente unos 37°C; una concentración de CO₂ de entre 3 y 7%, preferiblemente de aproximadamente el 5%).

60 Método 2) La segunda posibilidad es la administración del compuesto de interés al donante (por ejemplo, mediante infusión) y la extracción de una muestra de sangre total a continuación.

Entre la administración del compuesto de interés y la extracción de la muestra de sangre total existe un periodo de espera. Este periodo de espera es de entre 30 minutos y 24 horas.

Es posible una combinación de ambas alternativas, es decir, administrar el compuesto de interés al donante, extraer una muestra de sangre total del donante, y añadir el compuesto de interés a la muestra de sangre total.

Tras la exposición, la muestra se procesa adicionalmente. El procesamiento adicional incluye, pero no se limita a, la sustracción de las células sanguíneas de la muestra de sangre total. De manera opcional, también se sustraen de la muestra el fibrinógeno y los factores de coagulación. Preferiblemente, la muestra de sangre total se procesa adicionalmente en las 4 horas posteriores a la extracción del donante, más preferiblemente, en las 3 horas posteriores a la extracción de la muestra de sangre del donante. Lo más preferible, el procesamiento de la muestra de sangre total se lleva a cabo en los 30-60 minutos posteriores a la extracción de la muestra de sangre del donante. En caso de que se incube la muestra de sangre total con el compuesto de interés (exposición de acuerdo con el método 1 o una combinación de los métodos 1 y 2), el procesamiento adicional de la muestra de sangre se lleva a cabo tras el periodo de incubación, preferiblemente en los 5-60 minutos posteriores al tiempo de incubación.

La PTX-3 puede medirse en el suero o el plasma derivados de dicha muestra de sangre total. Las mediciones del nivel de PTX-3 pueden llevarse a cabo en plasma fresco o en suero obtenido a partir de la muestra de sangre total después de la incubación con el compuesto de interés. Alternativamente, el plasma o el suero pueden congelarse y descongelarse en otro momento para medir el nivel de PTX-3.

El término "plasma" hace referencia a la parte líquida de la sangre. El plasma se obtiene mediante la sustracción de las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos, trombocitos) mediante centrifugación. El sobrenadante (= plasma) contiene suero, fibrinógeno y otros factores de coagulación. El suero es, por tanto, el plasma sin los factores de coagulación.

El término "células sanguíneas" hace referencia a cualquier célula de cualquier tipo presente normalmente en la sangre. Las células sanguíneas incluyen, pero no se limitan a, eritrocitos (células sanguíneas rojas), leucocitos (células sanguíneas blancas), y trombocitos (plaquetas).

Se añade un anticoagulante a la muestra para prevenir o retrasar la coagulación de la muestra de sangre total o de plasma. Preferiblemente, el anticoagulante es heparina (por ejemplo, heparina sódica, por ejemplo entre 30USP y 143USP unidades de heparina sódica (lío-filizada) o de 60 a 90 USP unidades de heparina sódica (revestida por pulverización)), citrato (por ejemplo, a una concentración final de aproximadamente 0,4%) o oxalato. Habitualmente, el anticoagulante esté revestido en la superficie interna del contenedor (por ejemplo, un tubo) que contiene la muestra. Los expertos en la materia conocen tales tubos revestidos (por ejemplo, Vacutainer de BD Diagnostic Systems o vacuette de Greiner Bio-one). Otra posibilidad es la adición del anticoagulante a la muestra en los 5-15 minutos posteriores a la extracción (preferiblemente, menos de 5 minutos después de la extracción, más preferiblemente menos de 1 minuto tras la extracción) de la sangre. El plasma heparinizado es plasma que contiene heparina para prevenir la coagulación.

Los expertos en la materia conocen los métodos para la medición de PTX-3. Se puede medir mediante, por ejemplo, la utilización de un ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA). Los expertos en la materia conocen los ensayos ELISA. Para la medición de PTX-3, habitualmente se utiliza un ELISA en sándwich. Existen kits disponibles comercialmente (por ejemplo, N° Cat. ALX-850-299 de ALEXIS Biochemicals). Preferiblemente, el nivel de PTX-3 se mide con un ELISA de quimioluminiscencia potenciado (ECL).

Por ejemplo, se realiza un ELISA en sándwich mediante (1) el recubrimiento de un soporte sólido (por ejemplo, una placa) con un anticuerpo de captura; (2) la adición de la muestra (plasma), y cualquier antígeno presente se une al anticuerpo de captura; (3) la adición de un anticuerpo de detección que se une a un antígeno; (4) la adición de un anticuerpo secundario ligado a una enzima que se une al anticuerpo detector; (5) la adición de un sustrato, que se convierte en una forma detectable por acción de la enzima.

En un ELISA ECL, la enzima ligada al anticuerpo secundario convierte, directa o indirectamente, un sustrato de ELC en una forma que emite quimioluminiscencia. Una enzima adecuada es, por ejemplo, la enzima peroxidasa del rábano (HRP). Un sustrato adecuado para el ECL es, por ejemplo, el Luminal. La enzima cataliza la conversión del sustrato de ECL en un reactivo sensibilizado en la vecindad de la molécula de interés, que mediante una oxidación adicional mediada por peróxido de hidrógeno, produce un triplete (excitado) de carbonilo que emite luz cuando se descompone en el singlete de carbonilo. La quimioluminiscencia potenciada permite la detección de pequeñas cantidades de una biomolécula. Las proteínas pueden detectarse hasta en concentraciones femtomolares.

Otro método para la medición de PTX3 es un ensayo ELISA colorimétrico. En un ELISA colorimétrico, la enzima ligada al anticuerpo secundario convierte, directa o indirectamente, un sustrato en una forma que se puede detectar mediante espectrofotometría. Una enzima adecuada es la enzima peroxidasa del rábano (HRP) en combinación con, por ejemplo TMB (tetrametilbencidina), DAB (3,3'-diaminobencidina), AEC (3-amino-9-etilcarbazonol), o CN (4-clor-1-naftol). Otra enzima adecuada es una fosfatasa alcalina (AP) en combinación con, por ejemplo, fosfato de naftol AS-MX o nitro-azul tetrazolio/5-brom-4-clor-3-indoxilfosfato de p-toluidina (NBT/BCIP).

Un compuesto de interés tiene un riesgo de inducir CRS *in vivo* si el nivel medido de PTX-3 tras la exposición a dicho compuesto es significativamente superior en comparación con el nivel de PTX-3 de un control.

Un control es el nivel de pentraxina-3 de una muestra de sangre total no expuesta. Una no exposición significa que dicha sangre no ha sido expuesta al compuesto de interés ni a ningún otro compuesto del que se sepa que activa la liberación de citocinas bajo condiciones fisiológicas. Preferiblemente, la sangre no se expuso a ninguna sustancia antes del procesamiento.

Un aumento significativo significa que el nivel es superior en comparación con el nivel del control y que la diferencia con el nivel del control es estadísticamente relevante ($p \leq 0,05$, preferiblemente, $p \leq 0,01$).

Habiendo descrito hasta el momento, y de forma general, esta invención, se podrá entender de un modo mejor mediante la referencia a los ejemplos específicos, que se incluyen aquí con la mera intención de ilustrar y sin intención de limitar, a no ser que se especifique lo contrario, relacionados con las siguientes figuras.

Figuras

La figura 1 muestra una representación gráfica de la activación de los neutrófilos CD11 b⁺ (I) y la liberación medida de PTX-3 (II y III) en la sangre total tras la exposición a MabCampath[®], Synagis[®], Orthoclone OKT3[®] o LPS. Las muestras de sangre total se extrajeron de dos individuos diferentes, el donante 1 (figura 1A) y el donante 2 (figura 1B) y ambos se trataron durante 2 horas con (0,001 - 100 ng/ml) LPS (Δ), o el control positivo mAb MabCampath[®] ($\blacklozenge$), el control negativo Ab Synagis[®] ($\square$) y el mAb Orthoclone OKT3[®] de comparación ($\blacktriangle$) en el intervalo de concentración de entre 0,01 - 200 mg/ml correspondiente a los niveles de exposición al fármaco *in vivo* alcanzados habitualmente durante las primeras infusiones en humanos de las proteínas terapéuticas. Se determinó la expresión de CD11b mediante FACS (I) y se midió la liberación de PTX3 mediante un ELISA en sándwich personalizado colorimétrico (II) o electroquimioluminiscente (III) en el plasma (obtenido mediante la sustracción de las células sanguíneas de la muestra de sangre total).

La figura 2 muestra una representación gráfica de la liberación de TNF- α en la sangre total tras la exposición a MabCampath[®], Synagis[®], Orthoclone OKT3[®] o LPS. Las muestras de sangre total se extrajeron de dos individuos diferentes, el donante 1 (figura 2A) y el donante 2 (figura 2B) y ambos se trataron durante 2 horas con el control positivo mAb MabCampath[®] ($\blacklozenge$), el control negativo Ab Synagis[®] ($\square$) y el mAb Orthoclone OKT3[®] de comparación ($\blacktriangle$), o con (0,001 - 100 ng/ml) LPS (Δ). Se midieron las concentraciones de CD11b y PTX3 en el plasma (obtenido mediante la sustracción de las células sanguíneas de la muestra de sangre total). Habitualmente, el mAb MabCampath[®] activó una fuerte liberación de TNF- α en ambos donantes, que alcanzaron niveles máximos a 1 μ g/ml, mientras que el mAb Synagis[®] resultó negativo a cualquier concentración en ambos donantes. El mAb Orthoclone OKT3[®] mostró un aumento de TNF- α dependiente de la dosis sólo en la sangre de uno de los donantes (figura 2A), pero no en el otro donante (figura 2B).

La figura 3 muestra una representación gráfica de la activación medida de los neutrófilos CD11b⁺ (I) y la liberación medida de PTX3 (II) y TNF- α (III) en muestras de sangre total de 5-10 individuos sanos, que se analizaron tras 2 horas en presencia de diferentes concentraciones (200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 0,01 μ g/ml) del mAb MabCampath[®] ($\blacklozenge$), Orthoclone OKT3[®] ($\blacktriangle$), Synagis[®] ($\square$) y LPS (Δ). PTX3 y TNF- α se midieron en el plasma (obtenido mediante la sustracción de las células sanguíneas de la muestra de sangre total). A): donante 1, B): donante 2, C): donante 3, D): donante 4, E): donante 5, F): donante 6, G): donante 7, H): donante 8, I): donante 9, K): donante 10

La figura 4 muestra una representación gráfica de la cinética de la liberación de PTX3 (I), TNF- α (II) e IFN- γ (III) tras la exposición a MabCampath[®]. Eje Y: concentración medida de PTX3, TNF- α e IFN- γ en el plasma; Eje X: concentraciones de MabCampath[®] añadido a la muestra de sangre total (200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 0,01 μ g/ml). Las muestras de sangre total humanas se incubaron con MabCampath[®] durante 30 min. ($\blacklozenge$), 1 h. ($\blacktriangle$), 2 h. ($\square$) y 4 h. ($\circ$). Se muestran los resultados de 5 donantes sanos: A): donante 6, B) donante 7, C) donante 8, D) donante 9, E) donante 10.

La figura 5 muestra una representación gráfica de la cinética de la liberación de PTX3 (I), TNF- α (II) e IFN- γ (III) tras la exposición a Synagis[®]. Eje Y: concentración medida de PTX3, TNF- α e IFN- γ en el plasma; Eje X: concentraciones de Synagis[®] añadido a la muestra de sangre total (200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 0,01 μ g/ml). Las muestras de sangre total humanas se incubaron con Synagis[®] durante 30 min. ($\blacklozenge$), 1 h. ($\blacktriangle$), 2 h. ($\square$) y 4 h. ($\circ$). Se muestran los resultados de 5 donantes sanos: A): donante 6, B) donante 7, C) donante 8, D) donante 9, E) donante 10.

La figura 6 muestra las representaciones gráficas del rango dinámico de la liberación de TNF- α , (figura 6A), IFN- γ (figura 6B) y PTX3 (figura 6C). Para la determinación del intervalo dinámico, se incubaron las muestras de sangre de 10 donantes sanos durante 2 horas en presencia de las concentraciones indicadas de MabCampath[®]. Cada curva representa los datos recogidos de cada uno de los donantes 1-10.

La figura 7 muestra una representación gráfica del intervalo detectable de PTX con el ELISA ECL. Las mediciones se llevaron a cabo en el plasma obtenido mediante la sustracción de las células sanguíneas de las muestras de sangre total extraídas de los donantes 1-10. El gráfico estándar muestra la linealidad de los estándares medidos sobre el marco de la concentración y el intervalo de detección. A: indica la señal por encima del intervalo de detección, B: indica la señal en el intervalo de detección; C: indica la señal por debajo del intervalo de detección. Eje X: concentraciones (pg/ml), eje Y: intensidad de señal.

La figura 8 muestra una representación gráfica la liberación de PTX3 tras la exposición al anticuerpo similar a TGN11412, MabCampath (control positivo) y Eribitux (control negativo). La sangre de dos individuos diferentes se trató durante 24 h. con el control positivo mAb MabCampath® (○), o el control negativo Ab Eribitux® (◇) y el mAb de comparación similar a TGN1412 (■) en las concentraciones 0,1, 1,0, 10 y 100 µg/ml. La liberación de PTX3 (I) y TNF-α (II) se midió mediante un ELISA en sándwich personalizado de electroquimioluminiscencia. Figura 8A: donante A; figura 8B: donante B.

Ejemplos:

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1:

A) Materiales y métodos

Sustancias del ensayo

Dado que el mAb anti-CD28 TGN1412 que da lugar al CRS más severo (Suntharalingam G, et al., Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN 1412. N Engl J Med. 355 (2006): 1018-28), no estaba disponible públicamente, nosotros utilizamos un anticuerpo IgG humano anti-CD28 remanufacturado de forma similar a TGN1412, el mAb Muromonab-CD3 anti-CD3 (Orthoclone OKT3®) (Chatenoud L, Ferran C, Legendre C. In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by steroids. Transplantation. 49 (1990): 697-702) y, en particular, el mAb alemtuzumab anti-CD52 (MabCampath®) como estándares de referencia (Wing MG, et al. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH® 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. J Clin. Invest. 98 (1996): 2819-26), de acuerdo con el grupo científico de expertos en la primera fase de los ensayos clínicos (Informe final del ESG:EXPERT SCIENTIFIC GROUP ON PHASE ONE CLINICAL TRIALS, Informe final, Departamento de salud (RU), 30 de noviembre de 2006).

El comparador: muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un IgG2a anti-CD3 de ratón, Jansen Cilag AG, Suiza, lote N° BN6GSTV00, fecha de caducidad: abril de 2007, solución de reserva 10 mg/ml (concentrado a partir de una solución de infusión a 1mg/ml con Centricon Ultracel YM-100. N° Cat. 4211, Micon), la concentración y la pureza se evaluaron mediante el análisis de Bradford y la SDS-PAGE. Se almacenó en alícuotas a 4°C, y se diluyó de forma adicional en PBS (pH 7,4) (cf. "ensayo de la sangre total").

Se utilizó el mAb IgG2a anti-CD3 murino Orthoclone OKT3®, que da lugar al CRS en los pacientes con trasplante renal, como fármaco de referencia adicional. Resultó ser positivo para la liberación de TNF-α en el 40% de los casos ensayados (figuras 2, 3 y 6).

El anticuerpo humano remanufacturado IgG anti-CD28, similar a TGN1412, (basado en la secuencia publicada TeGenero TGN1412 en la patente US2006/0286104 A1) solución de reserva 11,2 mg/ml, la concentración y la pureza se evaluaron mediante el análisis de Bradford y la SDS-PAGE. Se almacenó a -80°C, se diluyó adicionalmente en PBS.

El control positivo: alemtuzumab (MabCampath®), una IgG1 anti-CD52 humanizada, Schering, Suiza, lote N° 42018R, fecha de caducidad: mayo de 2007; y 42019T, fecha de caducidad: diciembre de 2007, solución de reserva 10 mg/ml, líquido estéril, almacenado en alícuotas a 4°C; se diluyó adicionalmente en PBS (cf "ensayo celular de la sangre total").

El mAb humanizado IgG1 anti-CD52 MabCampath®, del que se conoce que activa con la primera dosis un CRS en los pacientes con leucemia, linfoma y esclerosis múltiple (Wing MG, et al., Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH® 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. J Clin. Invest. 98 (1996): 2819-26), se utiliza como control positivo para la liberación de citocinas y la activación concomitante de neutrófilos. MabCampath® indujo la liberación de TNF-α por encima del umbral de 60 ±10 pg/ml (cf "umbrales") en todas las muestras que se ensayaron excepto en una (figuras 2, 3 y 6, tabla 5). El primer donante del estudio cinético solamente llegó a este umbral de secreción de TNF-α después de 4 horas de la incubación con MabCampath®.

El anticuerpo control negativo: Palivizumab (Synagis®), una IgG1 anti-RSV humanizada, Abbott Laboratories, lote N° 30282 TF, fecha de caducidad: junio de 2008, solución de reserva 100 mg/ml; una reconstitución en agua libre de la endotoxina proporcionó el producto medicinal, almacenado en alícuotas a -80°C; se diluyó adicionalmente en PBS (cf "ensayo celular de la sangre total").

El mAb humanizado IgG1 anti-virus respiratorio sincitial (RSV) Synagis®, indicado para las enfermedades cardíacas congénitas en niños y que no se asocia a ningún tipo de CRS, se utiliza como control negativo. El mAb Synagis® resultó negativo para la liberación de citocinas en todos los casos ensayados (figuras 2, 3 y 6).

Erbitux (Cetuximab®), un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante de humano/ratón que se une específicamente al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), con el cual se presentaron reacciones de infusión severas en aproximadamente el 3% de los pacientes, solución de reserva 2 mg/ml, almacenado en alícuotas a 4°C, se diluyó adicionalmente en PBS.

Intervalo de concentración del fármaco

Los productos medicinales que se han de analizar se ensayan en el intervalo de concentración de entre 0,01 - 200 µg/ml (0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml o 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml). El intervalo cubre, en la mayoría de los casos, el nivel máximo de exposición del producto respectivo que se prevé dosificar por primera vez en humanos, tal y como se deriva del perfil farmacocinético (PK) respectivo. Todos los fármacos de referencia se analizan en paralelo en el mismo intervalo de concentración, cubriendo también así las exposiciones plasmáticas habituales de los fármacos respectivos en los pacientes tratados. Se incluyeron controles con PBS para determinar los niveles basales.

Las concentraciones de los fármacos >200 mg/ml son poco susceptibles al WBA dado que la citotoxicidad del fármaco de referencia, el mAb MabCampath®, lleva a la muerte de las células del torrente sanguíneo, y debido a las limitaciones en el volumen que se puede añadir a la sangre total para evitar una dilución inaceptable.

Ensayo celular de sangre total (WBA)

A menos que se especifique lo contrario, se extrajo la sangre total de donantes de sangre sanos en tubos vacutainer que contienen heparina de litio como anticoagulante (Blood Donation Center, Cruz Roja Suiza, Basel, Suiza, o Roche Pool). La sangre se procesó en las 1-3 horas posteriores a la extracción y se coincubó a 37°C durante entre 30 min. y 4 horas, y durante 24 horas con concentraciones crecientes del producto medicinal relevante. Los experimentos de prevalidación revelaron unas condiciones de ejecución óptimas cuando el procesamiento de la sangre se inicia a las 4 horas, ya que de otro modo, la lisis de los eritrocitos perturbaría el ensayo. Los productos medicinales, incluyendo los anticuerpos de referencia MabCampath®, Orthoclone OKT3® y Synagis®, se analizaron a las concentraciones siguientes: 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml. El anticuerpo similar a TGN1412 se analizó en las siguientes concentraciones: 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml. Se añadieron 195 µl de sangre en triplicados a los pocillos con fondo en U de las placas de 96 pocillos que contienen 5 µl de los productos por analizar. Estas condiciones aseguran un cumplimiento óptimo respecto a la factibilidad y eficiencia para conseguir, al menos, 70 µl de plasma y suficientes células para llevar a cabo la medición de multicitocinas de PTX3 en el plasma y, finalmente, el análisis celular de flujo citométrico de CD11b, respectivamente. La activación endógena de las células sanguíneas se evaluó mediante la introducción de controles que contienen PBS (Suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4).

Después de entre 30 min. y 4 horas/24 horas de incubación a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%, las placas se centrifugaron a 1.800 g durante 5 min. El sobrenadante (que contiene aproximadamente 70 µl de plasma) se sustrajo cuidadosamente y se congeló en alícuotas a -70°C. Se añadieron 70 µl de PBS (pH 7,4) al precipitado celular y se mezcló suavemente.

Ensayo múltiplex de TNF-α e IFN-γ (MSD)

Se descongeló el plasma para determinar las citocinas en el plasma. Los ensayos previos revelaron que los niveles de citocinas no diferían entre las muestras de plasma fresco y descongelado. La concentración de citocinas se determinó mediante un ensayo de citocinas humanas ultrasensible, de acuerdo con el protocolo del fabricante (MesoScale Discovery, Gaithersburg MA, EE.UU.) (Ensayo de citocinas humanas, placa personalizada MS2400 de TNF-α e IFN-γ humanos 2erPlex de MSD). Las placas se analizaron en un Sector Imager 2400 utilizando el programa de banco de trabajo MSD Discovery 2.0 (MesoScale Discovery, Gaithersburg MA, EE.UU.).

Los datos se presentan en forma de media de las mediciones de los sobrenadantes plasmáticos de los pocillos triplicados. Los resultados se expresan en pg/ml.

Clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS)

Para el análisis FACS se incubaron 50 µl de células de sangre total (véase ensayo celular de sangre total) durante 30 min. a temperatura ambiente con los anticuerpos CD45 PerCP, (Nº Cat. 345809, BD Pharmingen), CD11b PE (Nº Cat. 555388, BD Pharmingen) y CD16 FITC, (Nº Cat. 554406, BD Pharmingen). Después del tiempo de incubación, se añadieron 450 µl de la solución de lisis FACS (Nº Cat. 349202, BD Pharmingen) a la suspensión celular. Las células teñidas y fijadas se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad y se analizaron al día siguiente mediante citometría de flujo (BDFACSCalibur; programa CellQuestPro 4.0.2., BDBiosciences San José CA, EE.UU) para la regulación de CD11b sobre los neutrófilos CD16+/CD45+ (Nicholson et al. A novel flow cytometric assay of human whole blood neutrophil and monocyte CD11b levels: upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist. *Pulm Pharmacol Ther.* 20 (2007): 52-9.).

ELISA colorimétrico para PTX3 en plasma humano

Se desarrolló un ELISA en sándwich utilizando un juego de detección de PTX3 humana (Nº Cat. ALX-850-299, Alexis Biochemicals (ALEXIS Corporation, Lausana, Suiza). Después del recubrimiento durante la noche a 4°C con el anticuerpo de captura (700 ng/ml), se lavaron las placas de 96 pocillos (Nº Cat. 446612, Nunc Maxisorp™, Nunc A/S) con PBS-Tween al 0,05% y se bloqueó con PBS-tampón de gelatina al 0,2% durante 1-2 h. a 37°C. Se prepararon los calibradores mediante la dilución de la proteína PTX recombinante humana en PBS-Tween-BSA al 2% (Tween al 0,05%, PBS a pH 7,4). Las muestras y los calibradores se incubaron durante 2 h. a 37°C seguido del anticuerpo de detección biotinilado (50 ng/ml) durante 1 h. a 37°C. La reacción colorimétrica se inició mediante la incubación de las muestras con estreptavidina-peroxidasa (Nº Cat. 7100-05, Southern Biotech Birmingham, EE.UU) durante 45 min. seguida de TMB (Tetrametilbencidina, Nº Cat. T4444, Sigma San Luís, EE.UU) durante 15 min., y luego se paró con ácido sulfúrico. Las placas se leyeron a 450nm en un lector de ELISA utilizando el programa SoftMax Pro (Molecular Devices, EE.UU).

ELISA ECL para PTX3 en plasma humano

Las placas personalizadas MSD QuickPlex (MesoScale Discovery, Gaithersburg MA, EE.UU) y el inmunoensayo se diseñó para la medición de PTX3 mediante electroquimioluminiscencia, utilizando PTX; juego de detección en humanos (Nº Cat. ALX-850-299, Alexis). El anticuerpo de captura (1 µg/ml) se condujo con un enlazador QuickPlex (Nº Cat. K15A06-2, MesoScaleDiscovery) y el inmunoensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones de MSD (MesoScale Discovery, Gaithersburg MA, EE.UU). Las placas se analizaron en un Sector Imager 2400 Reader (MesoScale Discovery, Gaithersburg MA, EE.UU).

Los datos se presentan en forma de media de las mediciones de los sobrenadantes plasmáticos de los pocillos triplicados. Los resultados se expresan en ng/ml.

Definición del umbral (control positivo)

Las muestras se consideraron "positivas" (= riesgo elevado de aparición del CRS) con respecto a la inducción de citocinas causada por el producto medicinal respectivo, proporcionado de manera que se cumplieron estos dos criterios:

(i) Se midió el nivel de TNF-α que estaba por encima del punto de corte de 60 ± 10 pg/ml. Este umbral deriva de los datos *in vivo* procedentes del plasma de pacientes con esclerosis múltiple que desarrollaron CRS tras la infusión de MabCampath® (Moreau T, et al. Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. *Brain.* 119 (1996): 225-37.). 60 ± 10 pg/ml fue el nivel más bajo de TNF-α que se describió en la cohorte de pacientes respectiva asociado al CRS severo. Se observaron unos valores de TNF-α en un intervalo similar en el contexto de pacientes oncológicos que padecían un CRS tras la primera infusión de Rituximab (Winkler U, et al., Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic mentemphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab, IDEC-C2B8). *Blood.* 94 (1999): 2217-24).

(ii) El porcentaje de neutrófilos CD 11b+ superó el 30%.

Este umbral se explica por el hecho que, incluso en ausencia de liberación de citocinas, se observa la activación de neutrófilos en cierta mediada, logrando en algunas ocasiones valores de hasta un 25-30%, dependiendo del donante.

Evaluación estadística

Los valores medios y las desviaciones estándar se calcularon a partir de los triplicados. La evaluación del rango dinámico y el cálculo del coeficiente de la varianza se realizó con un GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, La Jolla, EE.UU.). Los LLOD y LLOQ se calcularon con LOD Fit 1.0 (Roche Pharma Informatics).

Relación de las evaluaciones *in vitro* con la liberación de citocinas *in vivo*

El protocolo de WBA prevé la coincubación de sangre heparinizada de individuos sanos o de pacientes en OKT[®] a 37°C durante hasta 4 horas, en las 1-3 h. posteriores a la extracción, con concentraciones crecientes del producto medicinal relevante. En el plasma derivado de esas muestras se analiza subsiguientemente la liberación de PTX3 y de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ .

Este protocolo mimetiza del modo más cercano posible la situación *in vivo*: los anticuerpos de los que se ha descrito que provocan el CRS, inducen la liberación sistémica de TNF- α y/o IFN- γ y, potencialmente, otras citocinas y quimiocinas, tales como IL-6, IL-8, en las 0,5-4 h. posteriores al inicio de la primera infusión (Moreau T, et al., Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. Brain. 119 (1996): 225-37; Suntharalingam G, et al., cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med. 355 (2006): 1018-28). Adicionalmente, en los pacientes con un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o que padecen un choque séptico, los niveles plasmáticos de PTX3 aumentan dramáticamente durante las primeras 24 horas y se correlacionan con la calificación clínica y la severidad de la enfermedad (Muller B, et al., Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients, Crit Care Med. (2001) 29:1404-1407). En conjunto, se cree que estos factores solubles activan y reflejan un número considerable de síntomas de severidad variable, aparentemente con relación a la cantidad, localización, tiempo y tipo de citocinas que se liberen y circulen en el torrente sanguíneo.

Criterios de valoración

Se han establecido dos tipos de criterio de valoración para evaluar el riesgo de liberación de citocinas inducida por fármacos: la secreción de citocinas proinflamatorias clave, tales como TNF- α e IFN- γ , y la regulación de la molécula de adhesión CD11b en los neutrófilos:

a. Citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ

Entre otras citocinas, las citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ se han descrito repetidamente en el contexto del CRS relacionado con una primera infusión. En primer lugar, el TNF- α parece ser la citocina que abre paso y que, cinéticamente, se libera primero a causa de los fármacos respectivos, con una cierta correlación entre la amplitud de la liberación del TNF- α y la severidad del CRS (Suntharalingam G, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med. 355 (2006): 1018-28; Winkler U, et al., cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic mentemphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab, IDEC-C2B8). Blood. 94 (1999): 2217-24).

Las citocinas indicadas se determinaron mediante la utilización del ensayo de citocinas humanas MSD ultrasensible (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), que permite la detección de múltiples analitos en una muestra de pequeño volumen. En comparación con el ELISA convencional, el sistema MSD tiene la ventaja del (i) amplio rango dinámico y la alta sensibilidad de la detección electro luminiscente de sulfo-TAG, (ii) la captura eficiente de los analitos mediante anticuerpos específicos inmovilizados en una matriz patronada sobre placas de múltiples puntos y (iii) la completa rastreabilidad hacia los registros de manufactura de la placa y el patrón de puntos del anticuerpo mediante un único sistema de código de barras.

b. Molécula de adhesión CD11b en los neutrófilos

Habitualmente, la liberación de citocinas se asocia a la filtración capilar y a la diapédesis de las células sanguíneas hacia los tejidos periféricos, lo que da lugar a una caída de la presión sanguínea y, en ocasiones, a fallo multiorgánico (Suntharalingam G, et al. cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med. 355 (2006): 1018-28.). Parece que los neutrófilos activados que expresan niveles elevados de la molécula de adhesión CD11b (Nicholson GC, et al., A novel flow cytometric assay of human total blood neutrophil and monocyte CD11b levels: upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist. Pulm Pharmacol Ther. 20 (2007): 52-9), pertenecen a un subtipo de células inmunológicas que están involucradas en la filtración capilar y sus consecuencias. Por consiguiente, las mediciones de la fracción de neutrófilos CD11b+ relacionan la liberación de citocinas proinflamatorias con potenciales eventos posteriores, tales como la activación de neutrófilos, la adherencia de los neutrófilo a las paredes de los capilares y la apertura concomitante del revestimiento epitelial, que lleva al síndrome de filtración capilar.

La fracción de neutrófilos activados puede determinarse mediante un citometría de flujo multicolor, seleccionando el subtipo de células sanguíneas CD45+/CD16+. Los cambios relativos del valor basal del porcentaje de células CD11b+ tras la adición del fármaco respectivo no se reevaluaron.

Umbrales

Citocinas:

Aparentemente, la cantidad de TNF- α secretado en el plasma se correlaciona con el número y la severidad de los síntomas asociados al CRS tras la primera dosis. Consecuentemente, la cantidad de TNF- α , tal y como se determina con el ensayo MSD, se considera como lo más relevante para la evaluación del riesgo. De acuerdo con los datos obtenidos *ex vivo* a partir de pacientes con esclerosis múltiple tratados con MabCampath® (Moreau T, et al., Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. Brain. 119 (1996): 225-37.) y pacientes con linfoma o leucemia tratados con Rituximab (Winkler U, et al., cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab, IDEC-C2B8). Blood. 94 (1999): 2217-24), se consideró que un nivel de TNF- α de 60 ± 10 pg/ml era un punto de corte razonable para diferenciar entre las muestras positivas y negativas. Este valor umbral se corresponde con el nivel mínimo de TNF- α que es suficiente para la inducción de una versión leve del CRS.

CD11b:

En ausencia de otras citocinas, se observó que el subtipo de neutrófilos CD11b+ alcanzaba niveles basales de hasta aproximadamente el 30%, bajo las condiciones del WBA descritas aquí. Consecuentemente, se utilizó el porcentaje del 30% como punto de corte. De este modo, sólo se consideraron como señal positiva los valores de neutrófilos de CD11b+ >30%.

En resumen, las muestras que alcanzan niveles de TNF- α >60 pg/ml y de neutrófilos CD11b+ >30% se consideraron "positivas" para el riesgo clínicamente relevante de liberación de citocinas.

Estabilidad longitudinal de la liberación de citocinas y activación de neutrófilos

La liberación de citocinas inducida por fármacos y la activación concomitante de neutrófilos en la sangre total de un individuo sano parece ser más estable longitudinalmente que significativamente variable. Por consiguiente, aquí no se repitió el estudio de la estabilidad longitudinal de la liberación de citocinas.

Cualificación técnica

Dado que el TNF- α resultó ser, en muchos de los casos, la primera citocina que cinéticamente se libera en los pacientes que padecen de CRS, parece ser que el TNF- α es la citocina clave para la evaluación del riesgo de CRS. Consecuentemente, el programa de cualificación técnica, detallado más abajo, se refiere principalmente a los datos obtenidos con el TNF- α .

No obstante, se ha estudiado una citocina adicional, el IFN- γ , con fines meramente confirmatorios.

El subtipo de neutrófilos CD11b+ se ha analizado en paralelo con tal de evaluar hasta qué punto la liberación del TNF- α se acompaña de la activación de neutrófilos, tal y como se determinó mediante la regulación de la molécula de adhesión CD11b. Como enfoque innovador, se midió la PTX3 en el plasma humano para evaluar su disponibilidad para traducir la activación de neutrófilos y para determinar si la PTX3 puede ser útil como parámetro adecuado para la evaluación del riesgo de CRS.

Se escogió el MabCampath® como el primer fármaco de referencia para la cualificación técnica del WBA, dado que la mayoría de los donantes de sangre mostraron una liberación de citocinas moderada-severa en presencia de MabCampath®.

Medición de PTX3 y activación de neutrófilos (resultados)

OKT3®

Las muestras de sangre de 2 individuos diferentes se trataron durante 2 h. con (0,001-100 ng/ml) lipopolisacárido (LPS) o con el control positivo mAb MabCampath®, el control negativo Ab Synagis® y el mAb comparador Orthoclone OKT3® en el intervalo de concentración de entre 0,01 y 200 μ g/ml que se corresponden con niveles de exposición al fármaco *in vivo* que habitualmente se alcanzan durante las primeras infusiones en humanos de proteínas terapéuticas. La expresión de CD11b se determinó mediante FACS. La liberación de PTX3 se midió mediante un ELISA personalizado en sándwich colorimétrico o electroquimioluminiscente.

Después de 2 horas de coincubación con sangre, todos los fármacos excepto Synagis® indujeron una regulación de CD11b mayor al umbral de 30% para la activación de neutrófilos en ambos pacientes. Además, el LPS, el MabCampath® y el Orthoclone OKT3® activaron la liberación dependiente de la dosis de PTX3 en ambas plataformas de ensayo ELISA. Las curvas de dosis de PTX3-respuesta del ELISA colorimétrico y del ECL mostraron una forma similar, aunque la comparación conjunta de las concentraciones medidas mostró una diferencia de unas 100 veces entre los dos métodos, con valores comprendidos entre 0,1–0,6 ng/ml frente a 10-60 ng/ml, respectivamente (figura 1).

Habitualmente, los niveles sanguíneos de PTX3 descritos en los ensayos clínicos y en los estudios *ex vivo* se comprenden entre niveles menores a 2 ng/ml en los controles y niveles de 800 ng/ml en los pacientes sépticos después de 8 horas (Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* (2006) 18: 10-15). Los valores se corresponden a la escala de concentraciones de PTX3 obtenidas con el ensayo ECL, favoreciendo así que este ensayo sea el método de elección para la medición de PTX3 en el presente estudio.

Anticuerpo similar a TGN1412

Se trató la sangre de 2 individuos diferentes durante 24 horas con el control positivo mAb MabCampath[®], o el control negativo Ab Erbitux[®] y el mAb comparador similar a TGN1412 en el intervalo de concentración de 0,1-100 µg/ml correspondiente a los niveles de exposición al fármaco *in vivo* que se obtienen habitualmente durante las primeras infusiones en humanos de proteínas terapéuticas. La liberación de PTX3 se midió con un ELISA en sándwich personalizado de electroquimioluminiscencia. Los resultados se muestran en la figura 8.

Precisión

Para determinar el método ELISA para PTX3 más preciso, se cargó el plasma derivado de dos donaciones de sangre total humana con concentraciones crecientes de PTX3 recombinante humana, cubriendo el intervalo que va de 0-2500 pg/ml. Subsiguientemente, la señal de PTX3 se midió mediante ECL frente al ELISA colorimétrico.

Tras las mediciones con el método ECL, el intervalo de recuperación de PTX3 para las concentraciones cargadas de 10-2500 pg/ml fue de entre 12-1365 pg/ml para un donante y 16-2104 pg/ml para el segundo (tabla 1).

Cuando las mismas muestras se midieron con el ensayo colorimétrico de PTX3 (tabla 1), los valores se comprendieron entre 355-6464 pg/ml.

En conclusión, la recuperación en la determinación de PTX3 en plasma humano heparinizado resultó ser más precisa mediante la utilización de la tecnología ELISA ECL. Por consiguiente, este método se seleccionó para mediciones futuras de PTX3 en el presente estudio.

Efecto de la matriz

Con tal de determinar hasta qué punto la matriz puede interferir en la detección de PTX3 se diluyeron estándares de PTX3 en plasma generado a partir de sangre procedente de dos donantes al que se le ha añadido los anticoagulantes heparina o EDTA. Las concentraciones recuperadas de PTX3 se compararon con las concentraciones de la curva estándar obtenidas en el diluyente calibrador.

Con el ensayo ECL, el porcentaje global de PTX3 recuperada en el intervalo de 10-2500 ng/ml fue de 85 ± 13 % en el plasma heparinizado y superior a 4000% en el plasma con EDTA (tabla 2).

El ensayo colorimétrico no es adecuado para la medición en sangre heparinizada, tal y como lo especifica el suministrador.

Sensibilidad

Se analizaron las muestras de 25 donantes de sangre sanos para determinar el límite inferior de detección (LLOD) y el límite inferior de cuantificación (LLOQ) ((Descripción técnica de la IUPAC) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, Pure and Applied Chemistry (2002) 74:835-855) para los criterios de valoración de PTX3.

El LLOD de la medición PTX3 resultó ser de 0,065 ng/ml y el LLOQ de 0,466 ng/ml (tabla 3). Esto está en consonancia con los valores proporcionados por el suministrador de los anticuerpos del juego de detección la PTX3 humana, con un LLOD de 75 pg/ml para la aplicación del ELISA.

Dado que sólo se consideraron relevantes los valores de PTX3 comprendidos entre 2-1000 ng/ml, de acuerdo con el análisis de PTX3 *ex vivo*, este ensayo está muy bien cualificado en relación con su sensibilidad para la medición de cambios significativos en los niveles de PTX3 en la sangre humana.

El análisis de citometría de flujo de CD11b se basa en la determinación de un subtipo de células con relación a todo el conjunto de células en la sangre total, para el cual se obtiene fácilmente una sensibilidad de <1,0% con los parámetros estándar del análisis citométrico de flujo. Dado que para la evaluación del riesgo sólo se consideraron relevantes los valores superiores al punto de corte de 30% de neutrófilos CD11b+, la sensibilidad de los análisis citométricos de flujo se considera adecuada.

Rango dinámico y cinética de la respuesta de PTX3

En relación al análisis de PTX3, habitualmente el rango lineal de la curva de calibración del ensayo ELISA ECL de PTX3 se comprende entre 0,6-2500 ng/ml. Este rango cubre el espectro completo de los valores de PTX3 observados en la sangre de pacientes *ex vivo* en ensayos clínicos o a lo largo de varias indicaciones (Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* (2006) 18: 10-15; Latini R., Maggioni A.P., Peri G., Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, Vago L, Pasqualini F, Signorini S, Soldateschi D, Tarli L, Schweiger C, Fresco C, Cecere R, Tognoni G, Mantovani A; Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* (2004) 110: 2349-2354; Muller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B, Mantovani A. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients, *Crit Care Med.* (2001) 29:1404-1407) con un pico de los valores de PTX3 en la sangre de los pacientes observado a las 6-8h en el rango entre 200-800 ng/ml durante la sepsis y el choque endotóxico.

En nuestro ensayo, la liberación de PTX3 aumentó con las concentraciones del fármaco y el tiempo de incubación sin alcanzar en ningún momento una meseta, a diferencia de los valores de las citocinas y los CD11b, que alcanzan un pico en el intervalo de concentración de fármaco utilizado. Pese a que la secreción de TNF- α e IFN- γ se intensifica con la duración de la incubación con el fármaco, después de 2 horas la magnitud de la secreción de citocinas es suficiente para alcanzar el valor umbral de 60 pg/ml en el 90% de los donantes evaluados.

Tras 2 horas de exposición con 0,01- 200 mg/ml de MabCampath® en sangre total, se obtuvieron valores máximos de PTX3 de entre 22-88 ng/ml a partir de 10 donantes sanos (figura 6C).

El rango dinámico de la liberación de PTX3 en respuesta al LPS 0,001-100 ng/ml es ligeramente más amplio, comprendido entre 22-91 pg/ml para los 5 individuos sanos evaluados (figura 6C).

En el ensayo de citometría de flujo para la determinación del subtipo de neutrófilos CD11b+, que indica la activación de los neutrófilos, el rango dinámico comprende el intervalo de entre 1-100%. De hecho, los valores que se obtienen habitualmente en la evaluación de la activación de neutrófilos se comprenden entre el 3-97% de neutrófilos CD11b+ (figura 3, tabla 5).

Para el análisis de TNF- α , la parte lineal de la curva de calibración del ensayo MSD se comprende habitualmente entre 10-10.000 pg/ml, cubriendo todo el conjunto de valores de TNF- α descritos en la sangre de los pacientes, en ensayos clínicos *ex vivo* o en la poscomercialización tras la infusión de fármacos que provocan el CRS (Moreau T, et al., Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. *Brain*. 119 (1996): 225-37; Moreau T, et al., Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. *Brain*. 119 (1996): 225-37; Winkler U, et al., cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab, IDEC-C2B8). *Blood*. 94 (1999): 2217-24).

De acuerdo con esto, a lo largo de las 4 horas de exposición con MabCampath® se obtuvieron valores máximos de liberación de TNF- α de entre 64-690 pg/ml en la sangre total de 9 donantes sanos. Para un donante, los niveles de citocinas a las 2 horas eran bajos, y la liberación de TNF- α no alcanzó el umbral de 60 pg/ml (figura 3, 4 y 5). Se observó un intervalo superior en los valores máximos de IFN- γ con concentraciones de entre 12-1904 pg/ml (figura 4).

Especificidad

La especificidad del ensayo de sangre total se estableció a dos niveles: (i) respuestas donante-específicas y (ii) respuestas fármaco-específicas.

La especificidad de donante se evaluó mediante el análisis de citocinas y CD11b en presencia del mAb MabCampath® y Orthoclone OKT3®: el donante 2 fue positivo con respecto a la secreción de TNF- α e IFN- γ en respuesta a MabCampath®. En contraste, el donante 1 no respondió al MabCampath® con respecto a la inducción de TNF- α e IFN- γ (figura 3, tabla 5). Las diferencias entre los donantes también se observaron en las mediciones de PTX3 con valores basales de 35 ng/ml para el donante 1 del estudio cinético frente a los valores de entre 3-5 ng/ml para los donantes 3, 4 y 5 (figura 4 y 5).

En ensayo también confirmó una especificidad de fármaco pronunciada: el mAb MabCampath® indujo la liberación de TNF- α e IFN- γ en el donante 3, mientras que el mAb Orthoclone OKT3® no lo hizo (tabla 5). Se observó una tendencia inversa en el donante 1, que respondió fuertemente al mAb Orthoclone OKT3® mediante la inducción de TNF- α e IFN- γ junto a una secreción de cantidades muy bajas de citocinas tras la exposición con el mAb MabCampath® (tabla 5).

Coeficiente de varianza: precisión entre las concentraciones y los donantes

Para evaluar en qué medida el coeficiente de varianza (CV) depende de la concentración del anticuerpo respectivo o de la elección del donante, se evaluaron las muestras de sangre de 10 individuos con el mAb MabCampath® a 5 concentraciones diferentes, y se comparó el valor del CV obtenido con las muestras de 1 donante a la concentración respectiva de MabCampath® con los valores del CV de otros 9 donantes. Además, se calcularon la media y la SD de todos los valores del CV de entre las concentraciones y se determinaron los valores del CV mínimo (CV_{min}) y máximo (CV_{máx}) por grupos (tabla 4).

El análisis de los valores del CV para la PTX3 revelaron unos valores del CV_{min} de entre 1,6-2,5% y unos valores del CV_{máx} de entre 13,4-23,5% (tabla 4), con la media de valores del CV que muestra una varianza muy baja entre las concentraciones (5,1-9,8%).

Se observó una distribución más amplia de los valores del CV con el ensayo de regulación de CD11b excepto para el extremo más bajo de la curva de concentración (CV_{min}: 1,0-8,6%, CV_{máx}: 4,7-42,0%, media del CV: 2,5-19,9%) (tabla 4).

En conclusión, los valores del CV de la PTX3 variaron moderadamente entre los donantes y las concentraciones, y no mostraron ninguna correlación con la concentración del fármaco. Tampoco hubo alteraciones significativas en los valores del CV observados entre las muestras de los diferentes donantes.

Estimación del umbral

Para evaluar un umbral por encima del cual se pudiera considerar que una liberación de PTX3 es significativamente positiva en el WBA, se determinó el valor de la media + 2 SD de las respuestas de PTX3 medidas tras 2 horas en presencia del control negativo mAb Synagis®. De todas las concentraciones y los 10 donantes de este estudio, este valor de punto de corte se corresponde con 25 ng/ml (tabla 6).

Consecuentemente, basándose en los presentes resultados, proponemos que se puede utilizar una concentración de PTX3 de 25 ± 5 ng/ml a las 2 horas como umbral para distinguir las respuestas positivas y negativas en el WBA.

En tales condiciones, los donantes 1-5 deberían considerarse positivos por sus respuestas tras 2 horas de incubación con el mAb MabCampath®, así como con el Orthoclone OKT3®. Es interesante que, con el mAb MabCampath®, el donante 1 sólo alcanzaría los umbrales de la liberación de TNF- α (64 ± 15 pg/ml) y de PTX3 ($22,7 \pm 3,5$ ng/ml). Además, la respuesta de PTX3 se correlacionaría con la secreción de citocinas en la calificación del donante 4 como positivo con el mAb MabCampath®, mientras que la regulación de CD11b fue inferior al 30% del umbral (tabla 5). Adicionalmente, el donante 3, que tal y como se esperaba no respondió a Synagis® en relación a la secreción de citocinas, también resultó ser negativo con respecto a la liberación de PTX3 ($13,99 \pm 0,6$ ng/ml). En contraste, el donante 1 del estudio cinético se consideraría positivo para la PTX3 independiente de la exposición al fármaco, debido simplemente a sus altos niveles basales de PTX3 ($36,45 \pm 2,01$ ng/ml con Synagis® durante 0,5h.).

En resumen, las muestras que alcanzan niveles de PTX3 >25 ng/ml en el plasma tras 2 horas pueden considerarse "positivas" con relación al riesgo de liberación de citocinas clínicamente relevante.

En comparación con el ensayo CD11b, que incluye subtipos de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) para evaluar el grado de activación de neutrófilos, parece que las mediciones de PTX3 basadas en la tecnología personalizada ELISA ECL tienen las siguientes ventajas:

- el plasma heparinizado es el compartimento relevante *in vivo*
- se evitan los pasos de dilución y la adición de Ficoll (necesario para la preparación de las PBMC)
- la presencia de juegos completos de células, que incluyen neutrófilos y eosinófilos en la sangre total
- formato de ensayo único (ECL) en vez de doble (ELISA y FACS)
- la evaluación se lleva a cabo en el periodo de tiempo relevante de 2 h., cuando se observan los síntomas típicos del síndrome de la liberación de citocinas *in vivo*

Tablas

Tabla 1: Precisión. Se compararon el ELISA de quimioluminiscencia potenciado (ECL) (tabla 1a) y el ensayo colorimétrico (tabla 1b) como métodos de detección de PTX3. Las mediciones se realizaron con el plasma de dos donantes que contenía los anticoagulantes heparina o EDTA. Se enriqueció el plasma derivado de dos donaciones de sangre total humana con concentraciones crecientes de PTX3 humana recombinante, cubriendo el intervalo de entre 0-2500 pg/ml. #: media de los triplicados, n.e.: no evaluable

Tabla 1a)

Concentración enriquecida de PTX3 (ng/ml)	PTX3 recuperada en el plasma (ng/ml) mediante el ensayo ELISA ECL								
	Sangre heparinizada				Sangre con EDTA				
	Donante α		Donante β		Donante α		Donante β		
	Media [#]	SD	Media [#]	SD	Media [#]	SD	Media [#]	SD	
2500	1365,37	16,66	2104,44	266,64	7737,86	245,14	9133,14	260,65	
625	382,18	19,49	636,31	36,54	7513,31	167,49	8897,38	99,69	
156	88,78	1,17	186,01	8,07	6749,16	109,70	8117,68	77,07	
39	25,45	0,67	54,16	6,84	3669,54	125,20	5739,99	216,99	
9,8	12,41	3,27	16,66	1,27	1144,22	91,47	1058,49	57,79	
2,4	11,25	16,66	7,28	266,64	281,20	245,14	168,54	260,65	

Tabla 1b)

Concentración enriquecida de PTX3 (ng/ml)	PTX3 recuperada en el plasma (ng/ml) mediante ensayo colorimétrico							
	Sangre heparinizada				Sangre con EDTA			
	Donante α		Donante β		Donante α		Donante β	
	Media [#]	SD	Media [#]	SD	Media [#]	SD	Media [#]	SD
2500	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
625	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
156	1,69	0,04	2,71	0,29	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
39	0,63	0,02	0,97	0,06	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
9,8	0,36	0,05	0,40	0,01	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
2,4	0,17	0,05	0,25	0,09	2,62	0,02	2,13	0,03

- 5 Tabla 2: efecto de la matriz. Se compararon el ELISA de quimioluminiscencia potenciado (ECL) (tabla 2a) y el ensayo colorimétrico (tabla 2b) como métodos de detección de PTX3. Las mediciones se realizaron con el plasma generado a partir de la sangre de dos donantes a que se le añadieron los anticoagulantes heparina o EDTA.

Tabla 2a)

Estándares (ng/ml)	PTX3 recuperada en el plasma puro (%), ensayo ECL							
	Plasma heparinizado				Plasma con EDTA			
	Donante α	Donante β	Media	SD	Donante α	Donante β	Media	SD
2500	55	84	69	21	310	365	337	39
625	61	102	81	29	1202	1424	1313	157
156	57	119	88	44	4326	5204	4765	620
39	65	139	102	52	9409	14718	12063	3754
9,8	127	170	148	31	11676	10801	11238	619
2,4	469	304	386	117	11717	7022	9370	3319
0,6	664	890	777	160	16366	7885	12126	5997

Tabla 2b)

Estándares (ng/ml)	PTX3 recuperada en el plasma puro (%), ensayo colorimétrico							
	Plasma heparinizado				Plasma con EDTA			
	Donante α	Donante β	Media	SD	Donante α	Donante β	Media	SD
2500	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
625	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

156	1,08	1,73	1,40	0,11	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
39	1,62	2,47	2,04	0,10	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
9,8	3,62	4,05	3,84	0,29	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
2,4	7,17	10,25	8,71	1,05	109	89	98,90	5,99
0,6	24,67	22,00	23,33	2,47	234	127	180,08	3,24

Tabla 3: Sensibilidad de la determinación de citocinas; Límite inferior de detección y límite inferior de cuantificación

Analito	Límite inferior de detección (pg/ml)	Límite inferior de cuantificación (pg/ml)
	LLOD	LLOQ
PTX3	65	466
TNF- α	0,007	0,057
IFN- γ	0,041	0,327

Tabla 4: Coeficiente de varianza (CV) para el análisis de PTX3 (tabla 4a) y CD11b (tabla 4b): precisión entre los donantes y concentraciones (de 0,1 a 200 μ g/ml). (SD = desviación estándar)

Tabla 4a)

mAb (μ g/ml)	PTX3			
	Media del CV (%)	SD del CV (%)	Cvmin (%)	Cvmáx (%)
200	5,10	4,18	2,04	15,65
100	8,04	5,69	1,65	13,45
10	7,80	4,67	2,32	16,02
1	9,86	4,34	2,56	15,47
0,1	8,27	6,10	1,96	23,59

Tabla 4b)

mAb (μ g/ml)	CD11b			
	Media del CV (%)	SD del CV (%)	Cvmin (%)	Cvmáx (%)
200	5,09	5,71	1,08	14,73
100	2,53	1,29	1,41	4,73
10	2,59	2,33	1,03	6,71
71	8,42	6,55	1,05	18,99
0,1	19,97	13,50	8,61	42,06

Tabla 5: liberación a las 2h. de TNF- α , IFN- γ y PTX3 y activación de neutrófilosTablas 5.1 Secreción de TNF- α inducida por Campath®

a)

Campath® (μ g/ml)	Secreción de TNF- α (pg/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	41,02	11,95	246,77	19,35	236,65	28,21
100,00	41,82	13,05	240,35	19,89	263,09	3,33
10,00	64,44	15,88	276,44	15,57	324,05	20,65
1,00	37,13	11,27	222,03	4,77	242,26	25,83
0,10	9,80	2,72	82,18	18,18	89,54	1,84
0,01	3,92	0,65	10,58	3,05	11,34	1,17

b)

Campath® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	54,53	36,72	31,81	262,24	253,00	225,08	266,09	233,99	209,86
100,00	32,54	36,18	56,74	252,07	217,39	251,59	263,89	265,95	259,44
10,00	82,15	51,48	59,69	264,84	270,35	294,14	347,16	307,42	317,56
1,00	33,56	28,09	49,76	216,72	223,42	225,95	267,82	216,17	242,80
0,10	6,69	10,96	11,75	101,40	65,26	79,89	90,07	87,49	91,05
0,01	3,22	4,50	4,05	11,28	13,22	7,24	11,24	12,56	10,22

c)

Campath® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	117,64	14,58	279,70	14,15
100,00	125,40	14,99	272,27	14,80
10,00	180,25	7,32	271,03	4,21
1,00	198,26	11,09	191,66	16,23
0,10	48,57	1,08	50,25	2,03
0,01	11,31	1,66	5,78	0,89

5

d)

Campath® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	133,50	104,84	114,58	295,85	273,72	269,51
100,00	123,92	111,21	141,09	264,04	263,41	289,36
10,00	186,81	172,35	181,59	275,38	266,99	270,71
1,00	210,35	195,87	188,55	201,69	200,34	172,93
0,10	49,62	47,46	48,63	49,33	48,84	52,58
0,01	11,86	12,62	9,43	5,52	6,77	5,05

Tablas 5.2 Secreción de IFN-γ inducida por Campath®

a)

Campath® (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	12,21	16,53	125,01	5,32	302,26	50,86
100,00	12,93	18,76	124,70	7,05	320,64	13,05
10,00	6,73	3,79	165,78	6,06	330,54	20,14
1,00	4,13	0,93	119,31	12,27	232,86	28,35
0,10	0,22	0,17	40,66	8,87	70,67	2,50

0,01	0,00	0,00	4,28	1,19	3,69	1,06
------	------	------	------	------	------	------

b)

Campath [®] (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	1,75	3,61	31,26	119,27	129,79	125,97	252,25	300,61	353,93
100,00	34,57	1,25	2,96	124,90	117,56	131,65	334,28	319,36	308,28
10,00	3,74	10,99	5,45	171,23	159,25	166,87	315,45	353,42	322,77
1,00	4,86	3,09	4,46	112,94	133,46	111,54	265,57	215,29	217,72
0,10	0,05	0,22	0,40	49,86	39,96	32,17	72,68	71,46	67,88
0,01	0,00	0,00	0,00	5,10	4,82	2,92	4,71	3,77	2,60

c)

Campath [®] (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	120,63	19,14	210,57	14,83
100,00	122,05	18,60	194,59	15,84
10,00	141,84	8,87	196,08	7,25
1,00	124,12	11,64	135,73	4,98
0,10	22,85	2,31	26,57	2,10
0,01	1,36	0,23	0,76	0,18

5

d)

Campath [®] (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	114,66	105,19	142,05	198,06	206,71	226,95
100,00	143,29	108,71	114,15	211,01	179,39	193,38
10,00	131,75	148,41	145,36	190,05	204,13	194,05
1,00	137,52	118,34	116,50	133,44	141,44	132,30
0,10	21,74	25,51	21,31	24,15	27,83	27,73
0,01	1,43	1,55	1,10	0,61	0,95	0,70

Tablas 5.3 Secreción de PTX3 inducida por Campath[®]

a)

Campath [®] (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	22,70	3,55	42,56	2,68	38,79	1,33
100,00	21,22	2,10	39,06	0,89	33,72	6,65
10,00	17,30	2,77	24,11	1,10	28,63	3,26
1,00	8,60	1,11	15,31	2,27	19,58	1,24

ES 2 388 828 T3

0,10	8,23	1,94	11,23	0,87	10,14	0,81
0,01	5,71	1,63	11,11	0,40	7,91	0,42

b)

Campath® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	20,18	26,77	21,17	40,94	45,65	41,09	40,18	37,54	38,66
100,00	19,05	23,24	21,38	40,05	38,33	38,79	41,31	30,97	28,89
10,00	15,51	20,49	15,90	25,27	23,95	23,09	25,02	29,51	31,36
1,00	9,52	8,91	7,37	13,44	14,65	17,83	18,54	19,25	20,96
0,10	7,84	10,33	6,51	12,16	11,11	10,43	10,07	10,98	9,38
0,01	5,85	4,03	7,29	10,87	11,57	10,90	7,84	7,53	8,35

c)

Campath® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	81,88	2,36	66,46	2,65
100,00	72,46	5,50	54,79	6,42
10,00	67,52	1,57	38,42	1,08
1,00	46,47	6,58	20,03	1,37
0,10	23,18	0,45	10,85	0,67
0,01	18,40	0,47	7,58	0,49

5

d)

Campath® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	79,16	83,30	83,18	63,96	66,17	69,24
100,00	77,27	66,46	73,66	61,04	55,12	48,21
10,00	67,35	66,04	69,16	37,30	39,44	38,53
1,00	42,48	42,88	54,06	19,81	18,79	21,50
0,10	23,12	22,76	23,66	10,21	11,54	10,79
0,01	17,96	18,89	18,34	7,45	8,12	7,18

Tablas 5.4 Activación de neutrófilos inducida por Campath®

a)

Campath® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	62,48	3,67	96,50	1,66	97,27	1,05
100,00	70,91	3,35	96,13	1,36	97,02	1,86
10,00	81,68	1,52	95,08	1,49	97,69	1,00

ES 2 388 828 T3

1,00	37,55	7,13	65,53	5,46	91,59	0,96
0,10	8,47	3,56	23,89	2,06	58,21	5,97
0,01	3,78	3,08	6,76	1,90	25,71	0,56

b)

Campath® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	66,33	62,08	59,03	97,04	94,64	97,82	96,08	98,08	97,66
100,00	73,65	67,17	71,91	96,36	94,67	97,36	97,16	95,10	98,81
10,00	83,36	80,41	81,26	93,41	95,55	96,27	98,02	96,56	98,48
1,00	32,88	34,01	45,76	59,30	69,47	67,82	92,66	91,28	90,82
0,10	12,23	5,15	8,02	23,04	26,24	22,40	65,09	54,49	55,04
0,01	7,33	2,13	1,87	7,86	7,86	4,57	25,06	25,99	26,08

c)

Campath® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	30,20	4,45	55,53	1,13
100,00	36,38	0,79	59,87	1,45
10,00	48,53	3,26	67,24	1,20
1,00	39,11	2,87	57,19	3,65
0,10	19,02	4,27	30,32	5,01
0,01	10,92	3,39	10,03	1,23

5

d)

Campath® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	34,96	26,15	29,48	56,67	55,49	54,42
100,00	36,98	36,68	35,49	58,29	61,15	60,18
10,00	50,80	44,80	50,00	65,88	67,68	68,15
1,00	39,77	35,95	41,59	60,25	53,15	58,18
0,10	23,78	17,75	15,54	32,82	33,58	24,55
0,01	14,78	9,54	8,44	11,39	9,70	8,99

Tablas 5.5 Secreción de TNF-α inducida por Orthoclone®

a)

Orthoclone® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	541,52	29,69	768,43	41,36	22,91	1,44
100,00	464,52	21,11	645,12	50,69	24,14	1,30

ES 2 388 828 T3

10,00	341,57	27,11	709,86	24,97	19,30	0,51
1,00	121,21	16,01	658,04	27,70	14,60	1,04
0,10	13,02	1,20	241,87	21,53	10,52	1,09
0,01	3,27	0,32	27,78	2,81	6,64	0,52

b)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	520,76	528,29	575,52	784,91	721,37	799,01	23,64	21,25	23,84
100,00	463,17	444,12	486,27	702,79	607,61	624,98	25,64	23,49	23,28
10,00	351,23	310,96	362,53	681,91	717,70	729,97	18,76	19,40	19,76
1,00	102,73	130,65	130,25	689,23	636,29	648,61	14,01	13,99	15,79
0,10	12,00	14,34	12,72	244,89	261,73	218,99	9,31	11,44	10,80
0,01	2,92	3,34	3,55	28,74	24,61	29,98	7,16	6,65	6,11

c)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	126,52	3,62	21,40	1,70
100,00	15,07	5,18	19,75	1,68
10,00	99,07	2,89	13,96	2,05
1,00	73,52	1,64	7,89	0,24
0,10	31,23	4,22	5,54	0,65
0,01	9,89	1,15	5,54	0,11

5

d)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de TNF-α (pg/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	128,50	122,24	128,53	19,58	22,95	21,66
100,00	109,12	118,62	117,46	19,44	21,56	18,24
10,00	102,36	97,93	96,93	12,25	16,24	13,41
1,00	74,08	71,68	74,80	7,71	7,80	8,16
0,10	35,60	27,19	30,90	5,10	6,29	5,23
0,01	8,57	10,69	10,40	5,54	5,43	5,65

Tablas 5.6 Secreción de IFN-γ inducida por Orthoclone®

a)

Orthoclone® (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	171,13	27,10	504,14	23,74	9,02	1,71

ES 2 388 828 T3

100,00	132,13	9,24	440,61	21,30	9,24	0,91
10,00	100,14	7,08	518,18	4,69	8,07	1,03
1,00	44,55	10,91	531,44	23,81	5,70	0,36
0,10	4,22	0,45	200,25	23,35	1,99	0,26
0,01	0,05	0,09	22,12	2,17	0,27	0,06

b)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	164,30	200,99	148,09	514,39	521,02	477,00	10,70	9,08	7,29
100,00	142,71	125,61	128,06	464,57	423,84	433,41	9,51	8,22	9,98
10,00	101,65	106,34	92,43	521,26	512,78	520,49	8,90	6,92	8,41
1,00	32,19	48,60	52,86	557,92	524,63	511,77	5,54	5,45	6,11
0,10	3,87	4,72	4,07	174,80	220,67	205,27	1,89	2,29	1,81
0,01	0,00	0,16	0,00	24,50	20,26	21,60	0,30	0,31	0,19

c)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	134,46	2,70	33,78	1,17
100,00	117,30	8,56	27,65	1,55
10,00	114,36	7,81	17,30	0,63
1,00	79,63	7,07	7,47	1,01
0,10	23,00	3,52	0,73	0,09
0,01	0,93	0,10	0,08	0,04

5

d)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de IFN-γ (pg/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	131,34	136,01	136,02	32,83	33,42	35,09
100,00	123,98	107,65	120,26	29,19	26,10	27,66
10,00	122,34	106,74	114,00	17,93	16,67	17,29
1,00	22,65	71,54	84,68	7,22	6,61	8,58
0,10	22,08	20,02	26,89	0,83	0,69	0,66
0,01	0,82	0,98	0,99	0,11	0,04	0,08

Tablas 5.7 Secreción de PTX3 inducida por Orthoclone®

a)

Orthoclone® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD

ES 2 388 828 T3

200,00	21,26	1,76	33,09	2,27	24,39	1,67
100,00	19,78	1,30	41,43	0,95	24,07	0,73
10,00	14,91	0,70	26,84	0,37	19,42	2,29
1,00	11,17	0,52	20,54	0,49	13,05	3,45
0,10	6,37	0,39	14,71	0,68	7,56	0,46
0,01	5,85	0,06	11,54	1,30	6,76	0,28

b)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	21,04	23,12	19,62	34,98	33,73	30,58	22,47	25,49	25,21
100,00	20,01	18,37	20,95	40,57	41,28	42,45	24,03	24,82	23,35
10,00	14,30	14,75	15,68	27,10	26,42	27,00	18,73	21,98	17,57
1,00	10,81	n.e.	11,54	20,40	20,14	21,09	15,04	9,06	15,05
0,10	6,15	6,15	6,82	13,92	15,16	15,05	7,76	7,89	7,04
0,01	5,92	5,81	5,82	11,47	12,87	10,27	6,44	6,94	6,91

c)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	80,72	3,23	44,06	12,75
100,00	87,95	1,44	31,20	4,28
10,00	56,57	0,53	30,27	1,11
1,00	46,54	7,17	19,51	1,98
0,10	28,23	1,18	7,57	0,17
0,01	18,85	1,00	7,89	0,48

5

d)

OKT3® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	77,64	80,45	84,09	47,73	54,57	29,88
100,00	87,12	89,61	87,12	28,53	36,14	28,94
10,00	56,70	55,99	57,03	30,77	29,00	31,04
1,00	41,94	42,89	54,80	18,10	18,65	21,78
0,10	27,07	28,19	29,43	7,40	7,56	7,74
0,01	19,46	17,69	19,40	8,42	7,49	7,78

Tablas 5.8 Activación de neutrófilos inducida por Orthoclone®

a)

Orthoclone® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	88,07	8,84	97,35	0,79	88,50	1,34
100,00	87,28	12,86	96,28	2,43	79,59	17,43
10,00	87,93	2,84	98,81	0,24	85,09	6,39
1,00	69,93	10,07	97,14	1,01	76,34	2,16
0,10	20,96	8,60	67,11	7,28	29,25	14,88
0,01	3,47	0,40	19,75	2,00	18,69	2,49

b)

OKT3® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	81,43	98,11	84,68	97,70	97,91	96,45	89,83	88,52	87,15
100,00	90,63	98,13	73,08	95,90	98,88	94,06	59,71	92,25	86,81
10,00	91,18	86,73	85,89	99,00	98,89	98,54	89,69	77,79	87,79
1,00	78,76	70,68	58,74	96,18	98,20	97,03	77,79	77,16	73,89
0,10	23,13	28,27	11,48	58,85	69,89	72,58	12,11	38,85	36,79
0,01	3,73	3,01	3,67	20,37	17,52	21,37	21,52	16,86	17,68

5

c)

OKT3® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	38,75	5,75	50,26	5,07
100,00	42,38	5,43	51,57	4,92
10,00	40,80	0,92	43,37	4,05
1,00	35,22	3,23	28,31	1,95
0,10	21,05	1,09	10,00	1,15
0,01	9,39	1,21	6,77	2,16

d)

OKT3® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	32,23	43,12	40,89	52,72	44,43	53,63
100,00	46,27	36,18	44,70	48,05	49,46	57,19
10,00	41,18	39,75	41,46	40,15	42,03	47,92
1,00	31,68	35,97	38,00	30,55	27,09	27,28
0,10	22,29	20,64	20,22	8,73	10,28	10,98
0,01	8,13	10,55	9,50	4,29	8,21	7,81

Tablas 5.9 Secreción de TNF- α inducida por Synagis[®]

a)

Synagis [®] (μ g/ml)	Secreción de TNF- α (pg/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	4,42	0,50	4,90	0,37	10,08	1,38
100,00	3,47	0,36	5,10	0,79	7,49	1,52
10,00	2,92	0,13	3,79	0,67	5,71	0,31
1,00	6,52	5,97	4,70	0,22	6,03	0,57
0,10	4,64	2,56	3,99	0,68	5,24	0,27
0,01	3,80	0,52	4,40	0,18	6,39	0,22

b)

Synagis [®] (μ g/ml)	Secreción de TNF- α (pg/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	n.e.	4,77	4,07	5,00	5,20	4,48	11,14	10,57	8,52
100,00	3,21	3,72	n.e.	5,81	5,23	4,25	9,18	7,08	6,22
10,00	n.e.	3,01	2,83	3,12	4,46	3,78	6,00	5,73	5,38
1,00	3,04	13,42	3,11	4,95	4,64	4,53	6,62	6,00	5,48
0,10	7,59	3,10	3,23	3,22	4,22	4,52	5,22	5,52	4,97
0,01	3,47	3,54	4,40	4,20	4,45	4,55	6,34	6,63	6,20

5

c)

Synagis [®] (μ g/ml)	Secreción de TNF- α (pg/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	11,32	1,90	19,33	2,83
100,00	8,82	0,99	12,66	0,27
10,00	8,95	0,54	10,32	1,64
1,00	8,72	1,37	8,13	0,77
0,10	7,20	0,17	8,02	1,09
0,01	8,41	1,19	7,75	0,51

d)

Synagis [®] (μ g/ml)	Secreción de TNF- α (pg/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	13,51	10,32	10,13	22,40	16,82	18,77
100,00	9,96	8,37	8,13	12,41	12,63	12,93
10,00	8,46	8,87	9,52	8,83	10,06	12,07
1,00	9,29	7,16	9,71	7,42	8,95	8,03
0,10	7,33	7,01	7,26	6,82	8,94	8,31
0,01	9,55	8,49	7,19	7,28	8,29	7,66

Tablas 5.10 Secreción de IFN- γ inducida por Synagis®

a)

Synagis® ($\mu\text{g/ml}$)	Secreción de IFN- γ (pg/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	16,26	19,96	0,67	0,59	0,28	0,12
100,00	11,96	12,63	0,62	0,55	0,26	0,09
10,00	5,42	7,76	0,69	0,65	0,19	0,03
1,00	1,14	1,03	0,81	0,65	0,18	0,06
0,10	0,00	0,00	0,51	0,19	0,15	0,06
0,01	0,15	0,17	0,56	0,19	0,21	0,03

b)

Synagis® ($\mu\text{g/ml}$)	Secreción de IFN- γ (pg/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	7,86	39,05	1,87	0,29	0,37	1,35	0,28	0,15	0,40
100,00	7,32	26,25	2,32	0,31	0,31	1,26	0,23	0,19	0,36
10,00	0,51	14,36	1,37	1,44	0,31	0,33	0,21	0,15	0,20
1,00	1,43	2,00	0,00	0,44	0,43	1,55	0,13	0,24	0,17
0,10	0,00	0,00	0,00	0,73	0,43	0,37	0,17	0,20	0,08
0,01	0,34	0,00	0,11	0,55	0,37	0,76	0,18	0,22	0,24

5

c)

Synagis® ($\mu\text{g/ml}$)	Secreción de IFN- γ (pg/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	0,24	0,16	0,44	0,05
100,00	0,19	0,20	0,34	0,12
10,00	0,21	0,09	0,16	0,02
1,00	0,20	0,08	0,06	0,02
0,10	0,14	0,05	0,08	0,04
0,01	0,11	0,01	0,08	0,08

d)

Synagis® ($\mu\text{g/ml}$)	Secreción de IFN- γ (pg/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	0,11	0,20	0,42	0,43	0,49	0,39
100,00	0,08	0,08	0,42	0,24	0,30	0,48
10,00	0,29	0,12	0,21	0,18	0,15	0,15
1,00	0,15	0,16	0,29	0,09	0,04	0,06
0,10	0,10	0,20	0,13	0,07	0,05	0,13
0,01	0,10	0,12	0,11	0,07	0,16	0,01

Tablas 5.11 Secreción de PTX3 inducida por Synagis®

a)

Synagis® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	14,00	10,32	17,08	1,14	13,99	0,61
100,00	10,43	6,53	13,26	0,40	10,80	0,46
10,00	8,88	5,59	12,57	0,23	6,86	0,28
1,00	5,87	0,37	12,21	0,83	6,62	0,19
0,10	6,06	0,42	11,27	0,03	5,92	0,25
0,01	6,30	0,32	11,09	0,50	6,55	1,12

b)

Synagis® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	8,37	25,90	7,71	17,16	18,18	15,90	14,03	14,58	13,37
100,00	17,97	6,36	6,97	13,05	13,01	13,72	10,29	10,59	11,17
10,00	15,33	5,56	5,75	12,42	12,46	12,83	7,09	6,95	6,55
1,00	5,45	6,17	5,97	11,94	11,56	13,14	6,64	6,80	6,42
0,10	5,64	6,48	6,07	11,29	11,24	11,28	5,64	6,11	6,02
0,01	5,93	6,53	6,44	10,76	11,67	10,85	6,98	7,38	5,28

5

c)

Synagis® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	38,94	3,62	19,33	2,83
100,00	28,17	1,42	12,66	0,27
10,00	19,27	1,77	10,32	1,64
1,00	17,51	1,19	8,13	0,77
0,10	17,48	1,46	8,02	1,09
0,01	17,80	1,45	7,75	0,51

d)

Synagis® (µg/ml)	Secreción de PTX3 (ng/ml)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	38,95	42,56	35,32	22,40	16,82	18,77
100,00	27,79	26,97	29,73	12,41	12,63	12,93
10,00	17,25	20,00	20,55	8,83	10,06	12,07
1,00	18,11	16,14	18,28	7,42	8,95	8,03
0,10	17,67	18,85	15,94	6,82	8,94	8,31
0,01	18,87	18,38	16,15	7,28	8,29	7,66

Tablas 5.12 Activación de neutrófilos inducida por Synagis®

a)

Synagis® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)					
	Donante 1		Donante 2		Donante 3	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
200,00	4,30	0,24	11,63	1,44	38,83	1,70
100,00	3,94	1,42	5,08	2,04	29,74	2,53
10,00	2,33	0,00	3,55	1,19	18,85	1,86
1,00	3,92	2,38	4,10	0,79	16,52	2,56
0,10	3,00	1,16	3,65	1,40	12,71	3,89
0,01	2,58	0,68	3,68	0,41	15,16	2,47

b)

Synagis® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)								
	Donante 1			Donante 2			Donante 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
200,00	4,47	4,13	n.e.	11,47	10,27	13,14	40,78	37,64	38,08
100,00	4,94	2,93	n.e.	7,16	3,09	4,98	30,86	31,52	26,84
10,00	2,33	2,33	n.e.	4,53	3,89	2,23	18,43	17,24	20,88
1,00	3,67	1,67	6,41	3,80	4,99	3,50	15,01	15,08	19,47
0,10	2,27	2,40	4,34	4,69	4,19	2,06	15,01	14,90	8,21
0,01	3,07	1,80	2,87	3,51	4,15	3,39	13,02	17,86	14,59

5

c)

Synagis® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)			
	Donante 4		Donante 5	
	Media	SD	Media	SD
200,00	18,63	3,13	17,81	2,04
100,00	13,78	1,22	14,07	3,27
10,00	10,65	1,09	10,25	1,04
1,00	8,58	2,11	9,42	1,16
0,10	7,59	1,07	7,71	1,16
0,01	7,48	1,03	8,35	0,91

d)

Synagis® (µg/ml)	Regulación de CD11b (%)					
	Donante 4			Donante 5		
	1	2	3	1	2	3
200,00	18,70	15,46	21,72	19,73	18,04	15,66
100,00	13,17	12,99	15,18	17,35	10,81	14,06
10,00	11,91	9,96	10,08	9,05	10,75	10,95
1,00	10,95	6,90	7,89	8,09	10,16	10,02
0,10	7,77	6,45	8,56	6,40	8,14	8,59
0,01	7,61	6,40	8,44	7,80	7,84	9,40

Synagis® (µg/ml)		PTX3 (ng/ml)												
		Donante												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media	SD	
200,00		14,00	17,08	13,99	38,94	19,33	57,30	30,58	14,15	16,37	14,08	23,58	14,52	
100,00		10,43	13,26	10,80	28,17	12,66	50,59	18,84	12,08	14,49	8,96	18,03	12,72	
10,00		8,88	12,57	6,86	19,27	10,32	46,38	14,32	10,14	7,99	6,73	14,34	11,89	
1,00		5,87	12,21	6,62	17,51	8,13	44,83	13,03	10,16	7,15	6,53	13,20	11,71	
0,10		6,06	11,27	5,92	17,48	8,02	44,97	12,38	9,42	7,29	5,63	12,84	11,87	
0,01		6,30	11,09	6,55	17,80	7,75	44,16	12,17	10,18	7,20	6,07	12,93	11,56	
		Medias y SD de todas las concentraciones											16,40	4,51
		Media + 2 SD											25,42	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 5 <120> Ensayo de seguridad de anticuerpos
 <130> 25129
 <150> EP 08158724.8
 10 <151> 20-06-2008
 <160> 1
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 381
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <300>
 <308> NP_002843
 <309> 28-04-2008
 25 <313> (1) .. (381)
 <400> 1
 Met His Leu Leu Ala Ile Leu Phe Cys Ala Leu Trp Ser Ala Val Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Asn Ser Asp Asp Tyr Asp Leu Met Tyr Val Asn Leu Asp Asn
 20 25 30
 Glu Ile Asp Asn Gly Leu His Pro Thr Glu Asp Pro Thr Pro Cys Ala
 35 40 45
 Cys Gly Gln Glu His Ser Glu Trp Asp Lys Leu Phe Ile Met Leu Glu
 50 55 60
 Asn Ser Gln Met Arg Glu Arg Met Leu Leu Gln Ala Thr Asp Asp Val
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala
 85 90 95
 Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu Ala Arg
 100 105 110
 Leu Thr Ser Ala Leu Asp Glu Leu Leu Gln Ala Thr Arg Asp Ala Gly
 115 120 125
 Arg Arg Leu Ala Arg Met Glu Gly Ala Glu Ala Gln Arg Pro Glu Glu
 130 135 140

ES 2 388 828 T3

Ala	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Thr	Arg	
145					150				155						160	
Ala	Asp	Leu	His	Ala	Val	Gln	Gly	Trp	Ala	Ala	Arg	Ser	Trp	Leu	Pro	
			165					170						175		
Ala	Gly	Cys	Glu	Thr	Ala	Ile	Leu	Phe	Pro	Met	Arg	Ser	Lys	Lys	Ile	
		180						185					190			
Phe	Gly	Ser	Val	His	Pro	Val	Arg	Pro	Met	Arg	Leu	Glu	Ser	Phe	Ser	
		195					200					205				
Ala	Cys	Ile	Trp	Val	Lys	Ala	Thr	Asp	Val	Leu	Asn	Lys	Thr	Ile	Leu	
210						215					220					
Phe	Ser	Tyr	Gly	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Tyr	Glu	Ile	Gln	Leu	Tyr	Leu	
225					230					235					240	
Ser	Tyr	Gln	Ser	Ile	Val	Phe	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Glu	Asn	Lys	Leu	
			245						250					255		
Val	Ala	Glu	Ala	Met	Val	Ser	Leu	Gly	Arg	Trp	Thr	His	Leu	Cys	Gly	
		260						265					270			
Thr	Trp	Asn	Ser	Glu	Glu	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Trp	Val	Asn	Gly	Glu	
		275					280						285			
Leu	Ala	Ala	Thr	Thr	Val	Glu	Met	Ala	Thr	Gly	His	Ile	Val	Pro	Glu	
	290					295					300					
Gly	Gly	Ile	Leu	Gln	Ile	Gly	Gln	Glu	Lys	Asn	Gly	Cys	Cys	Val	Gly	
305					310					315					320	
Gly	Gly	Phe	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Phe	Ser	Gly	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	
			325						330					335		
Asn	Ile	Trp	Asp	Ser	Val	Leu	Ser	Asn	Glu	Glu	Ile	Arg	Glu	Thr	Gly	
			340					345					350			
Gly	Ala	Glu	Ser	Cys	His	Ile	Arg	Gly	Asn	Ile	Val	Gly	Trp	Gly	Val	
	355						360					365				
Thr	Glu	Ile	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Ser				
	370					375						380				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para la determinación del riesgo de un compuesto de inducir un síndrome de liberación de citocinas en un humano que incluye los pasos de:
- 10 a) proporcionar una muestra de sangre total, donde dicha sangre se expuso al compuesto, al menos durante 30 minutos.
- 10 b) medir el nivel de pentraxina-3 (PTX-3) en dicha muestra, y
- 15 c) comparar el nivel medido de pentraxina-3 con un control, donde el control es el nivel de pentraxina-3 de una muestra sangre total no expuesta, donde un aumento significativo del nivel de pentraxina-3, en comparación con el control indica un riesgo para dicho compuesto de inducir un síndrome de liberación de citocinas.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el nivel de PTX-3 se mide en el plasma o en el suero obtenido a partir de una muestra de sangre total.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la sangre total contiene un anticoagulante.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el plasma contiene un anticoagulante.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde el anticoagulante es heparina.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la incubación de la muestra de sangre total con un compuesto de interés se inicia en las 4 horas posteriores a la extracción de la muestra de sangre.
- 30 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la muestra de sangre total se incuba con el compuesto de interés durante entre 30 minutos y 24 horas.
- 30 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el nivel de pentraxina-3 se mide con un ELISA de quimioluminiscencia potenciada.

Figura 1A:

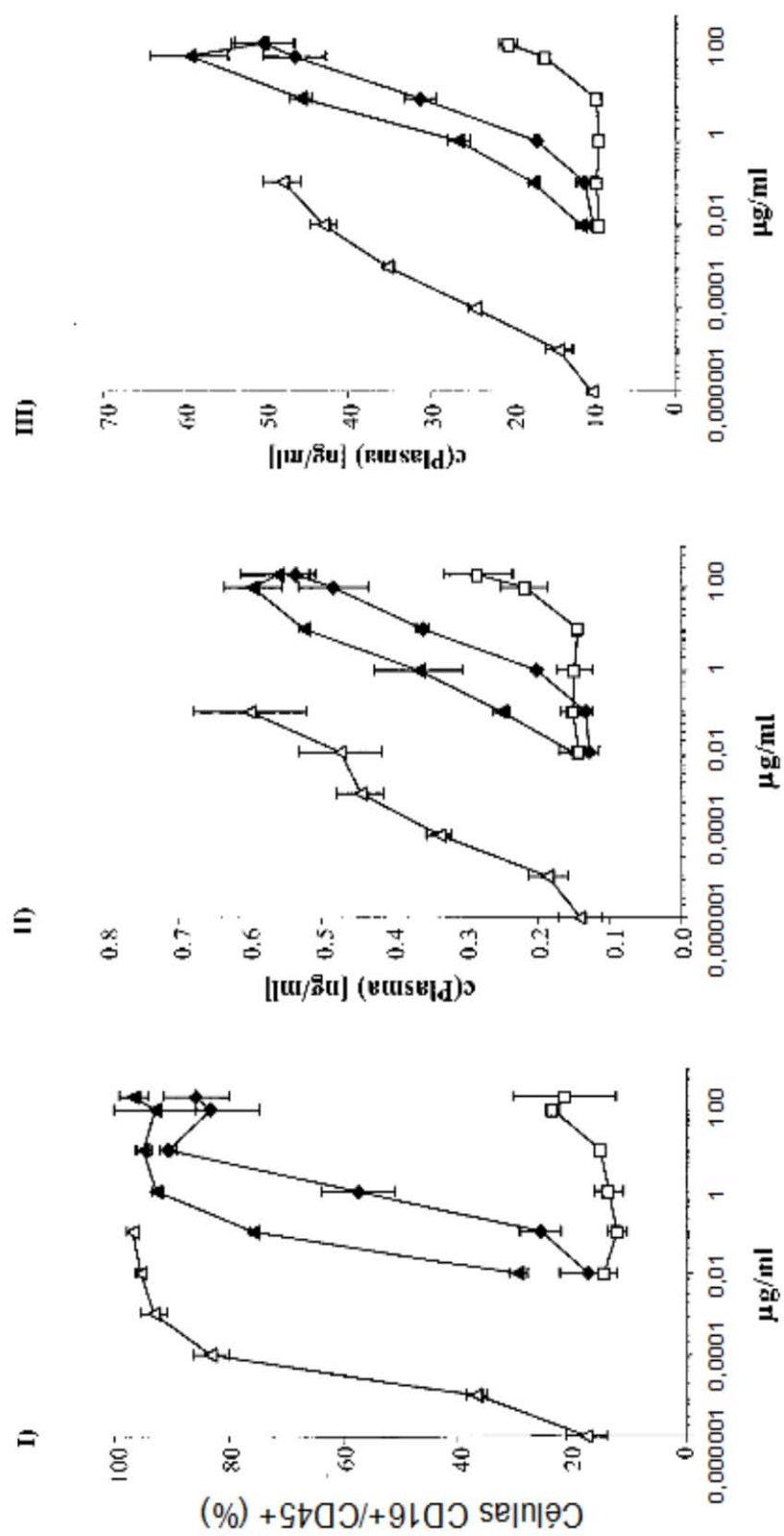


Figura 1B:

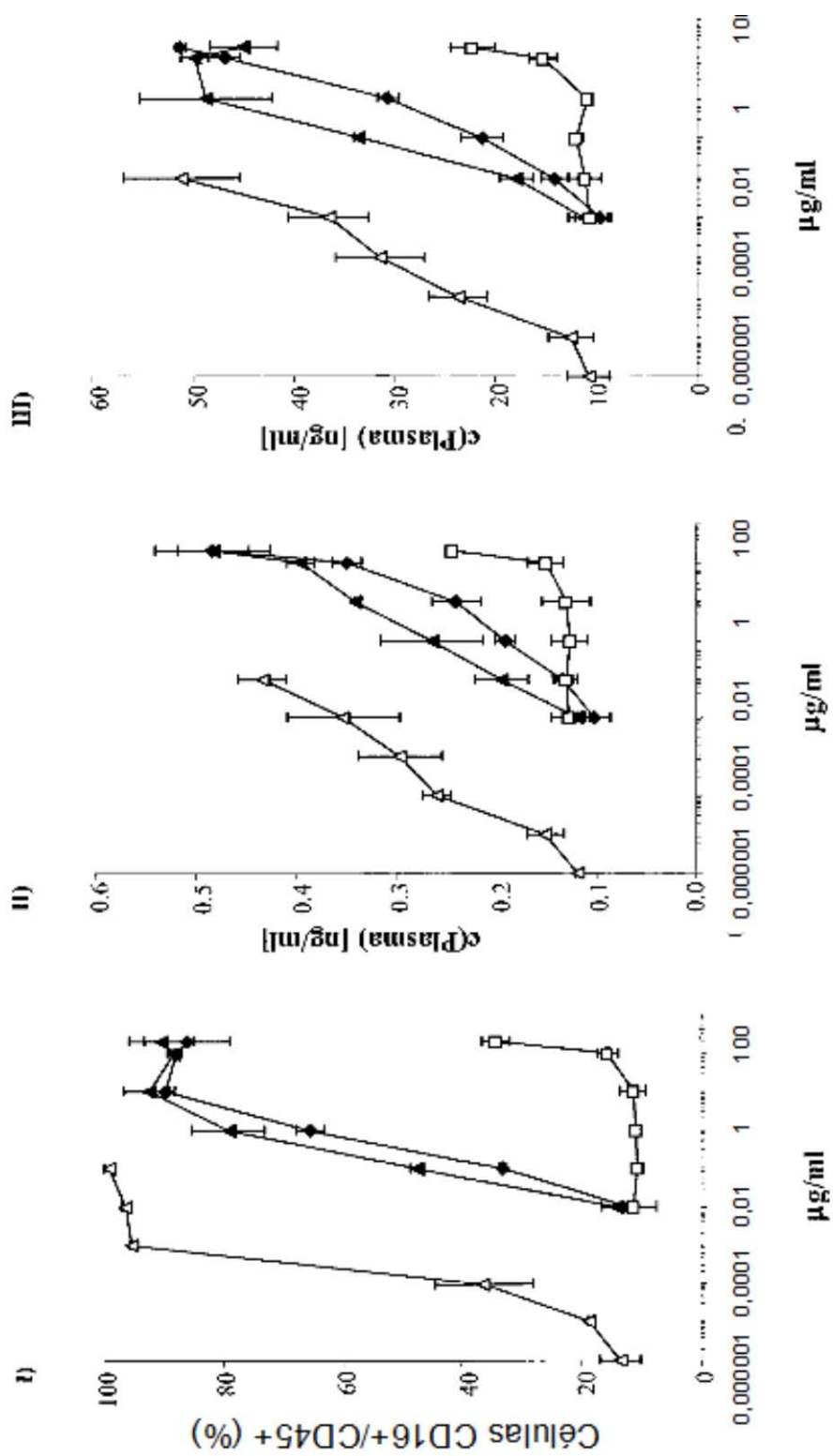


Figura 2A:

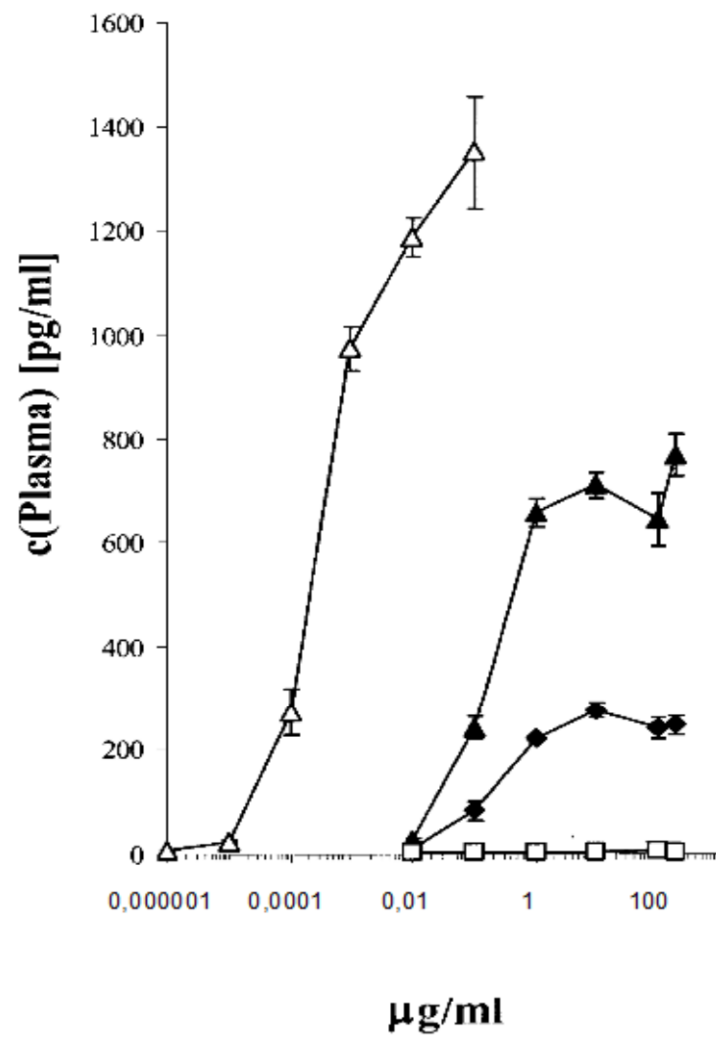


Figura 2B:

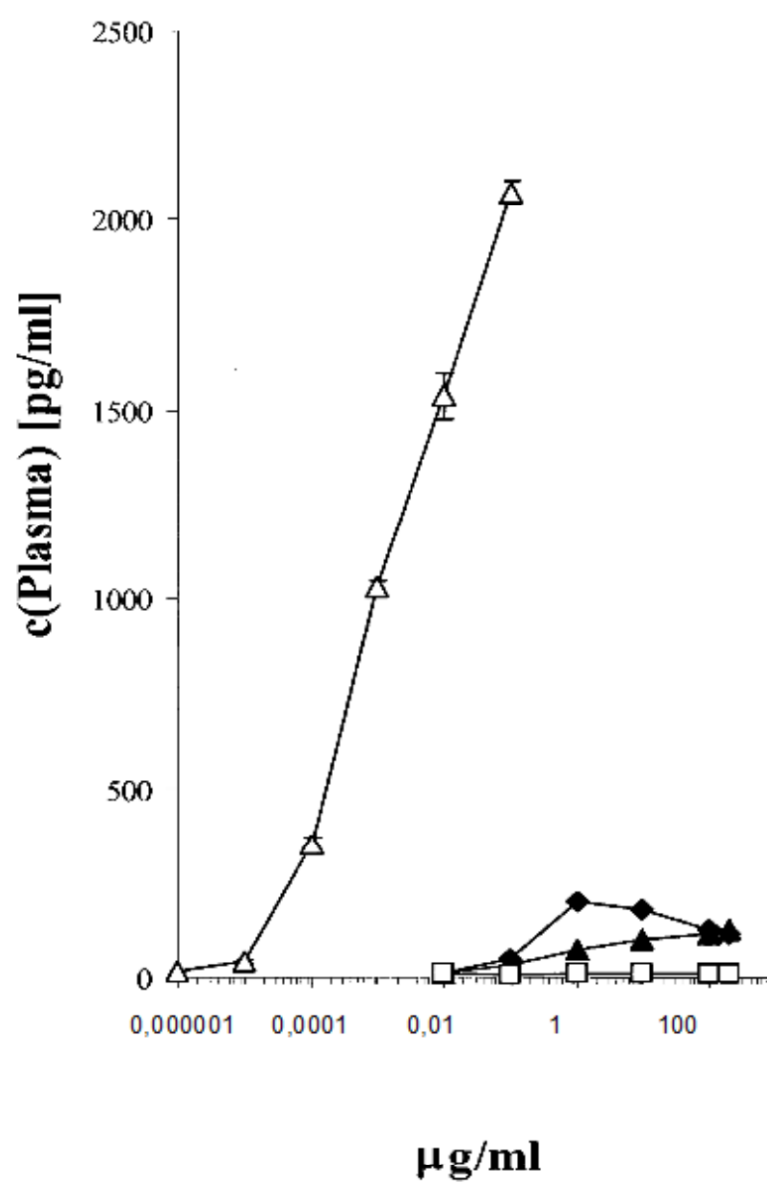
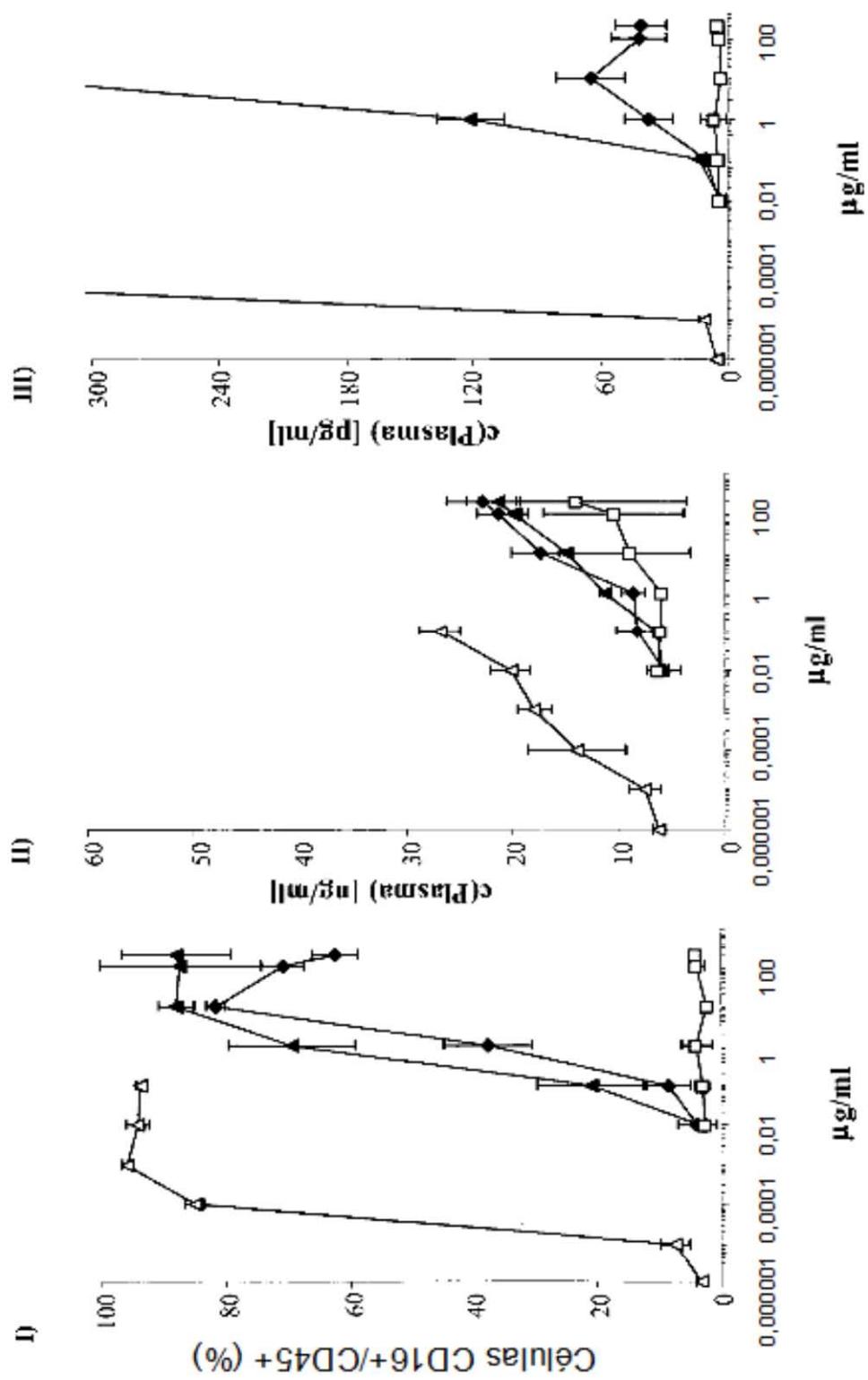


Figura 3A:



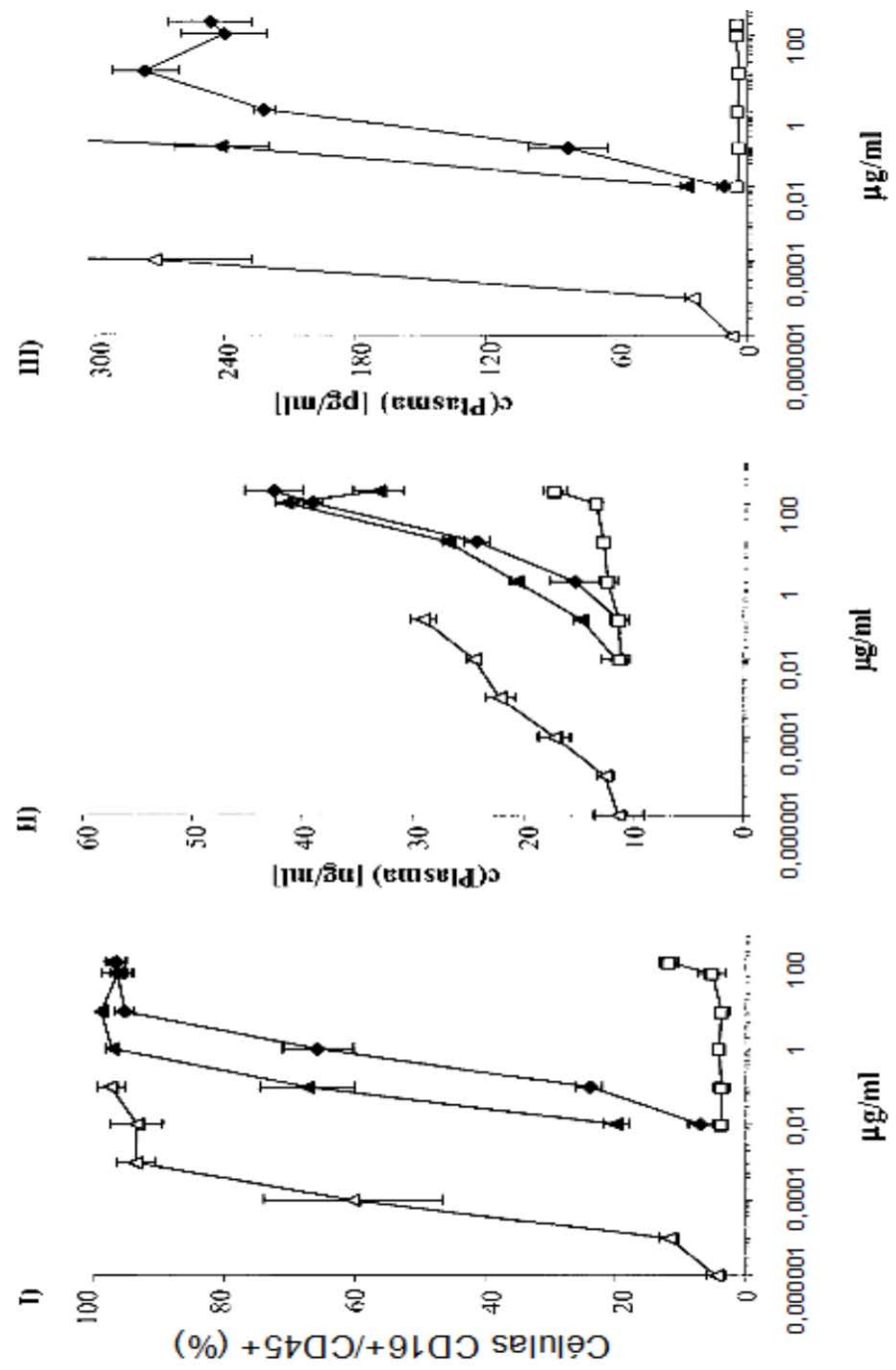


Figura 3B:

Figura 3C:

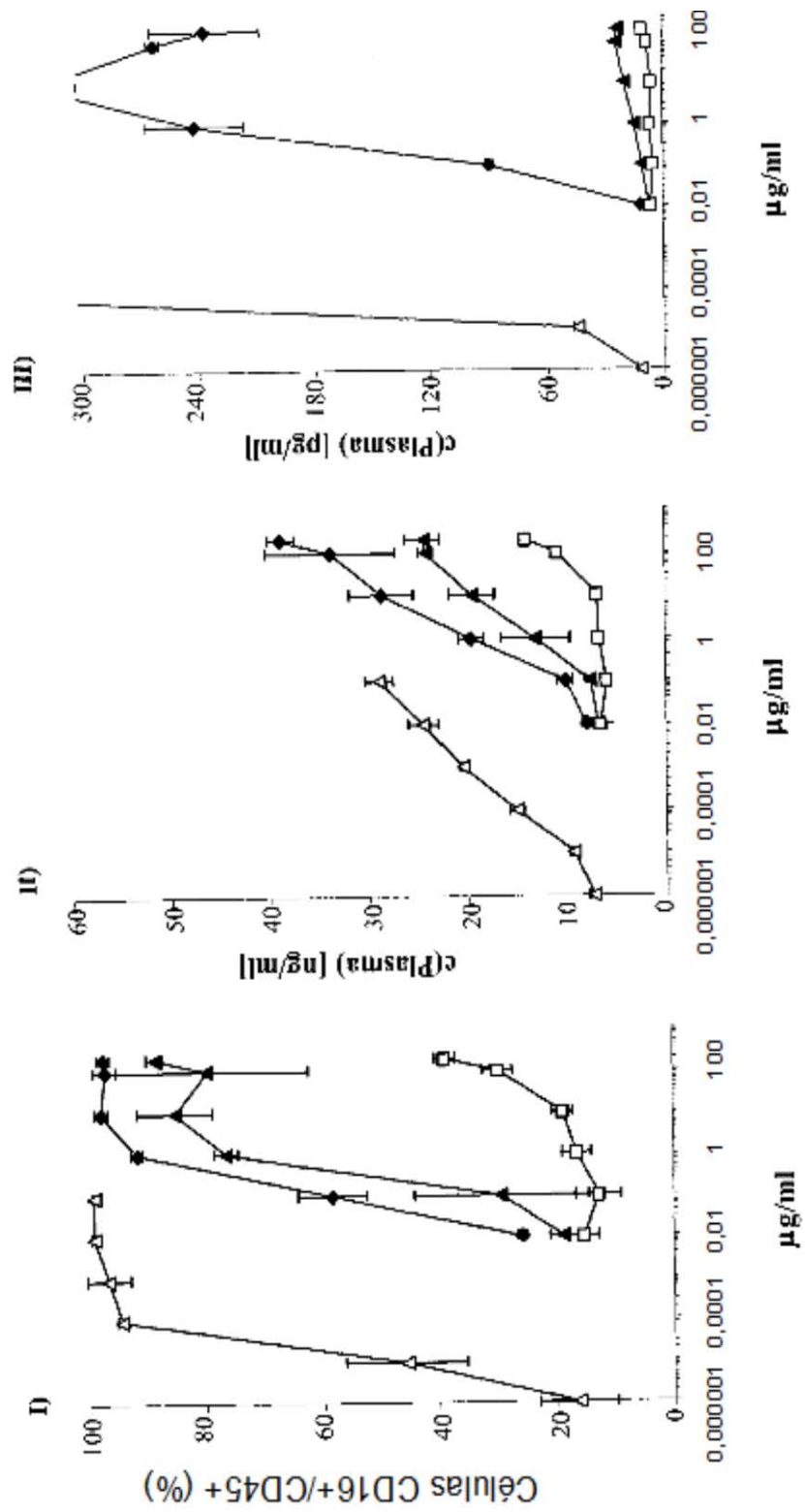


Figura 3D:

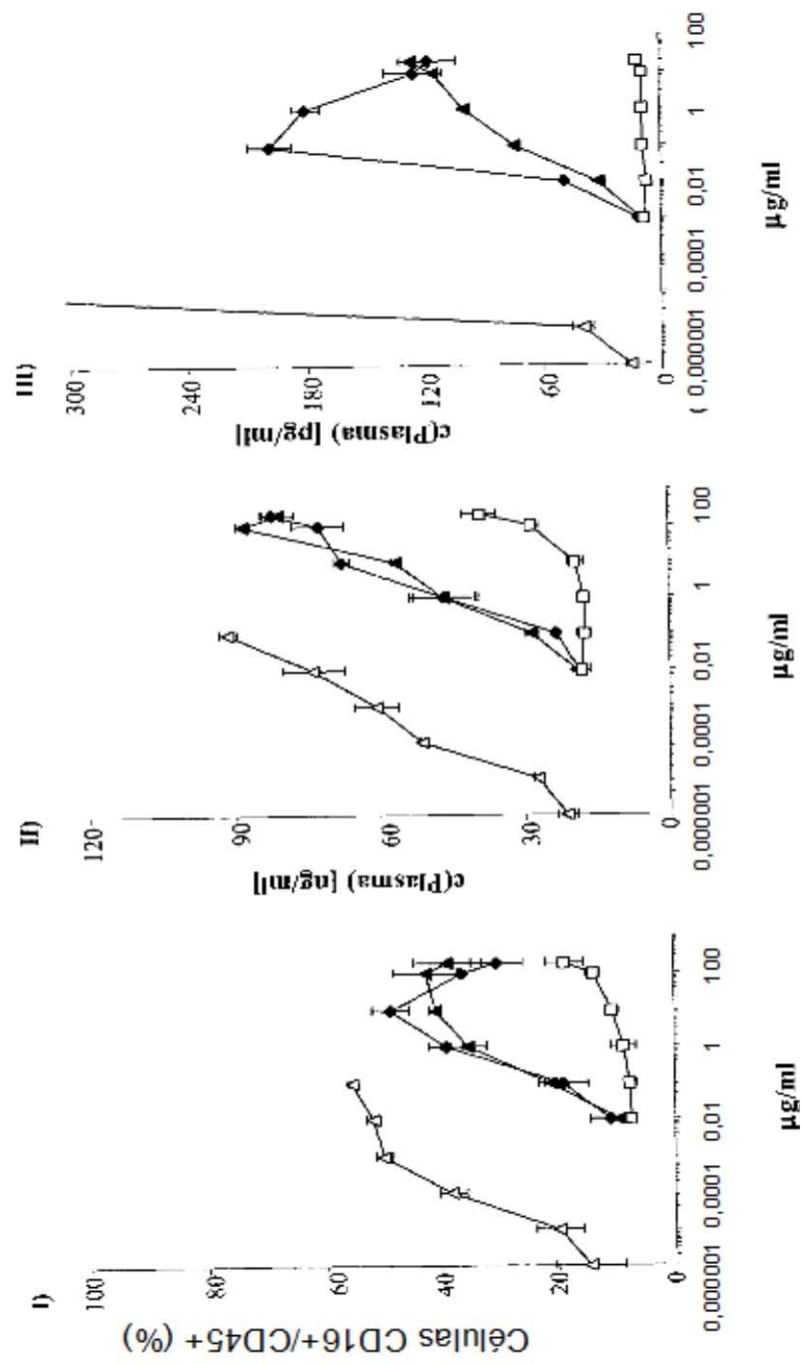


Figura 3E:

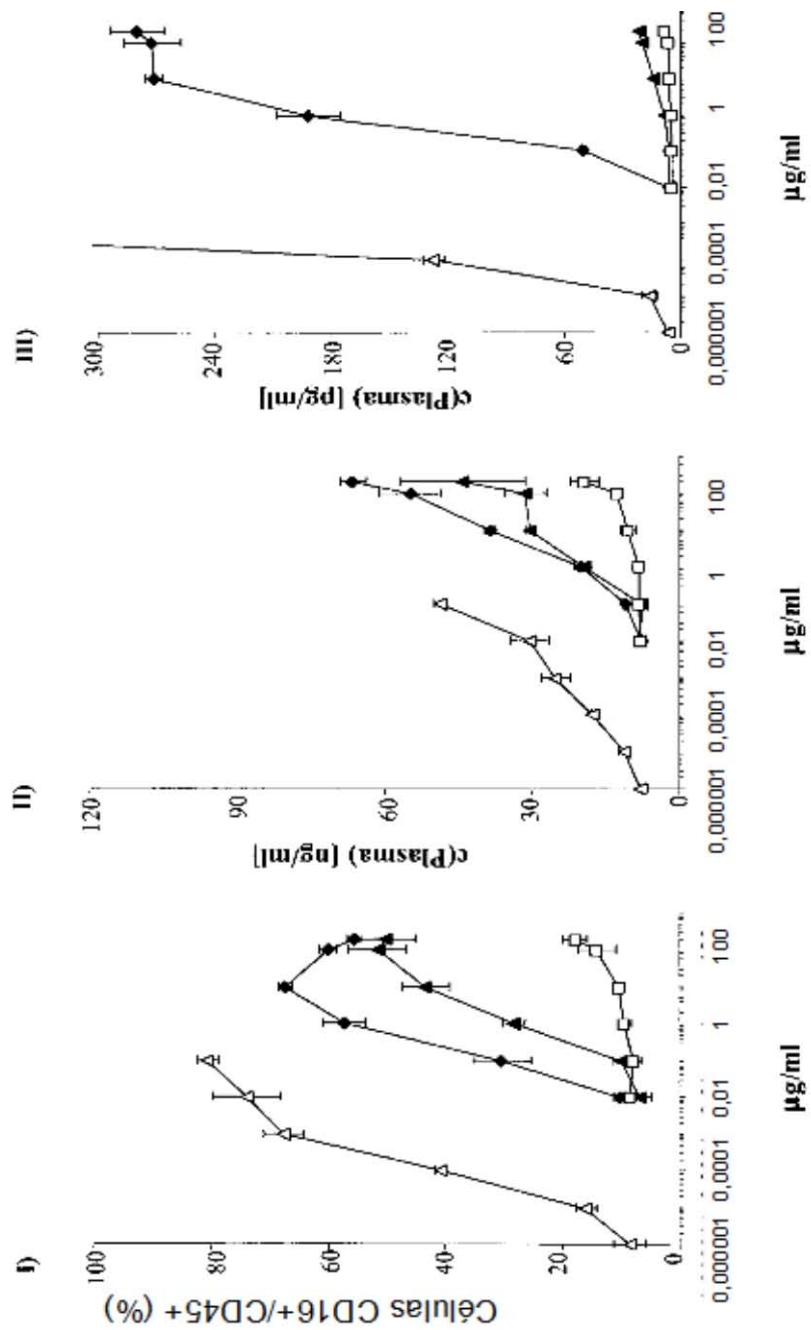
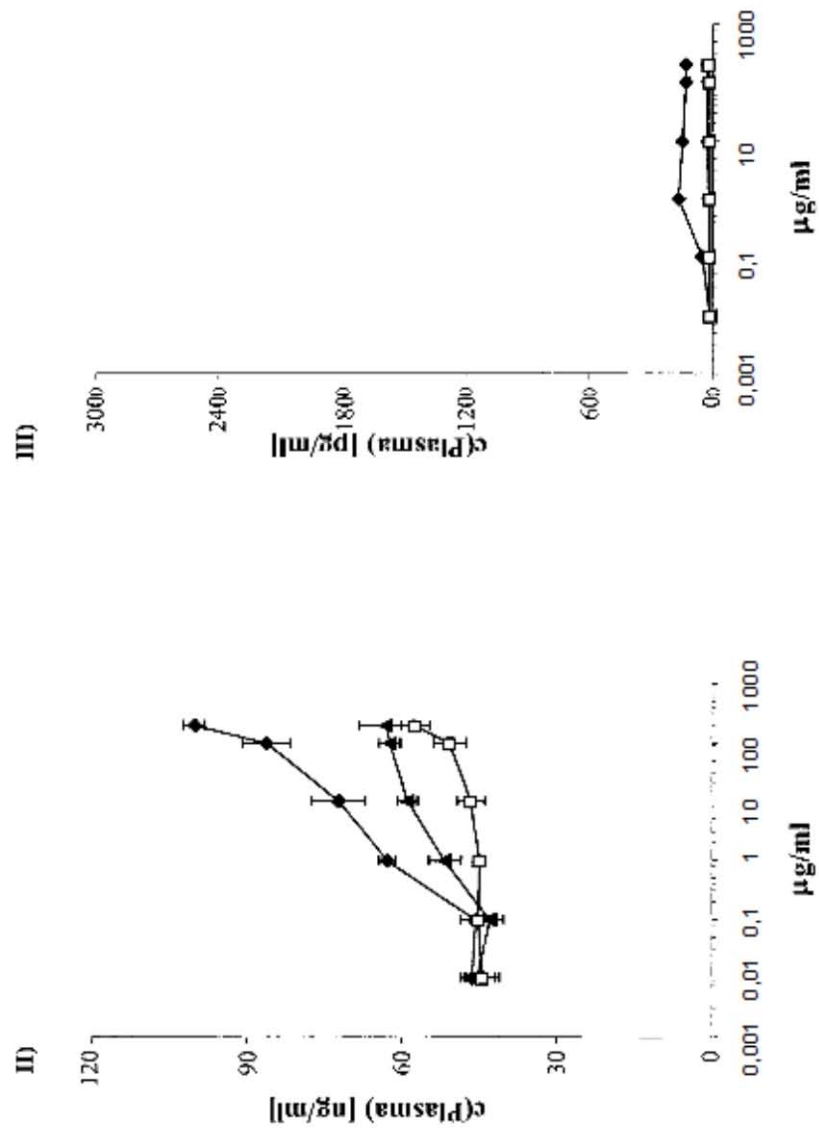


Figura 3F:



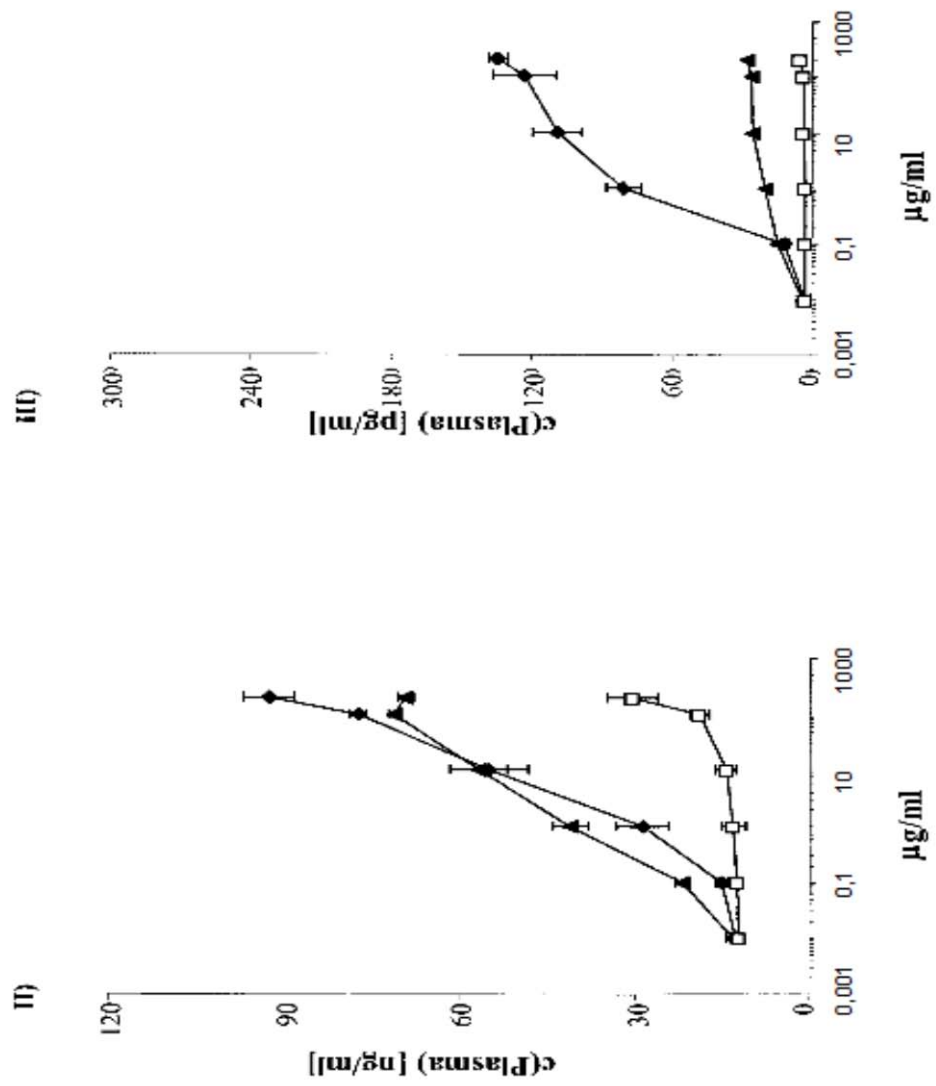


Figura 3G:

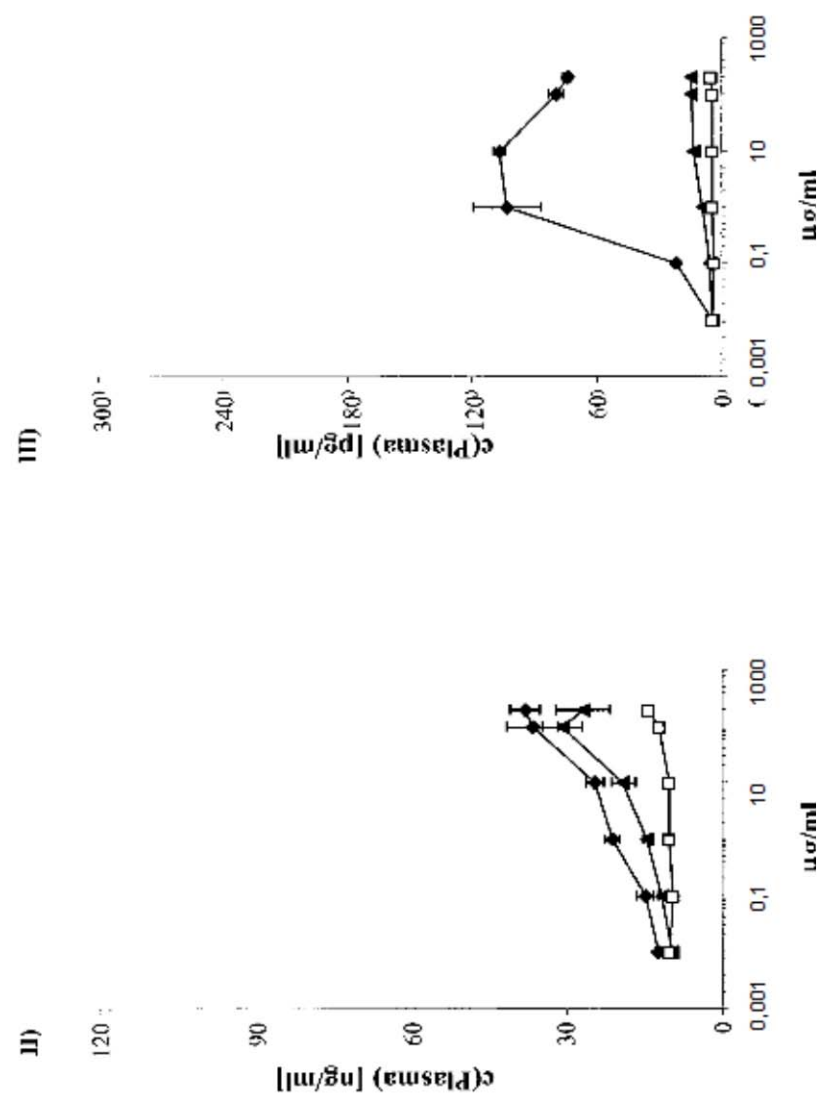
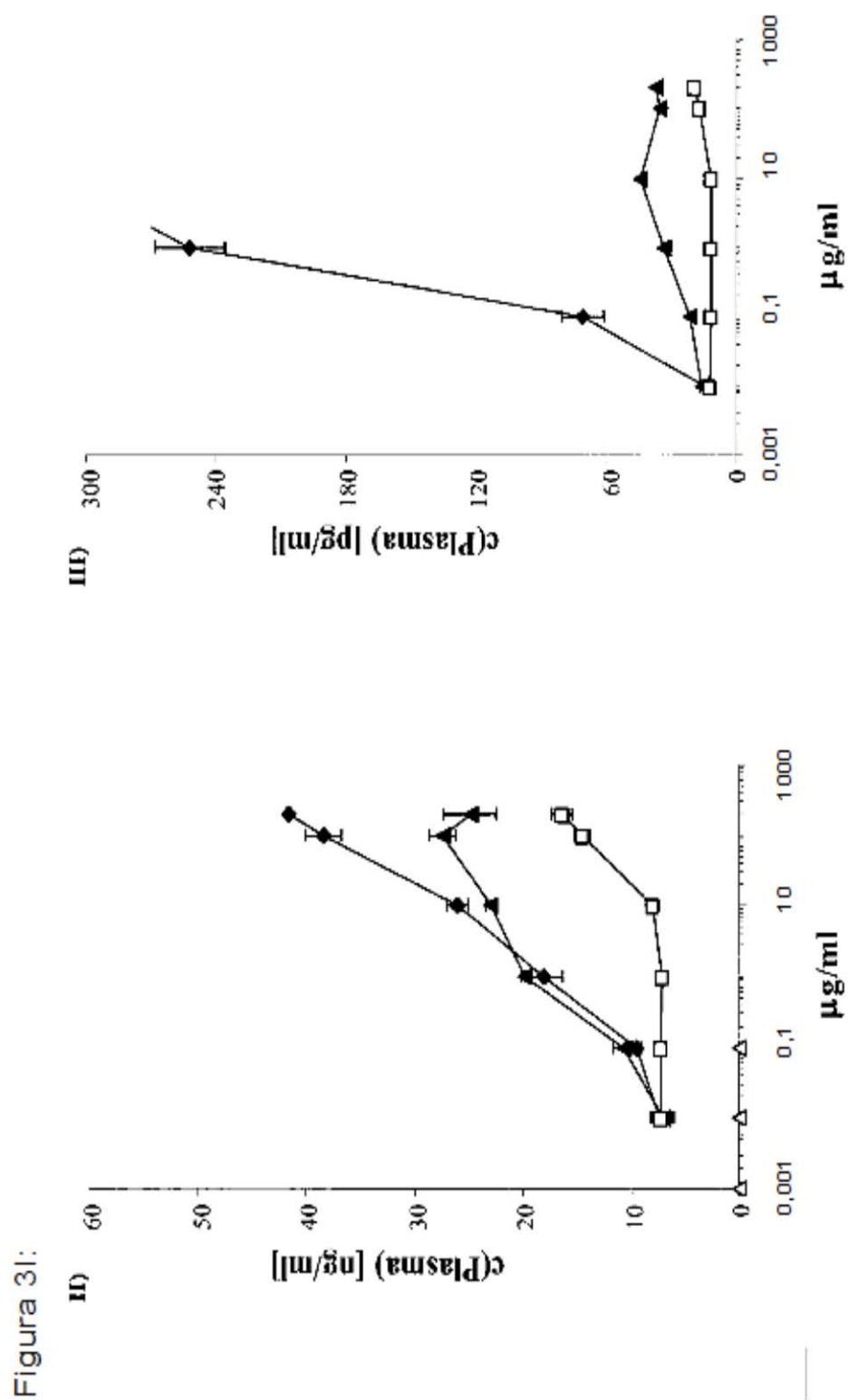


Figura 3H:



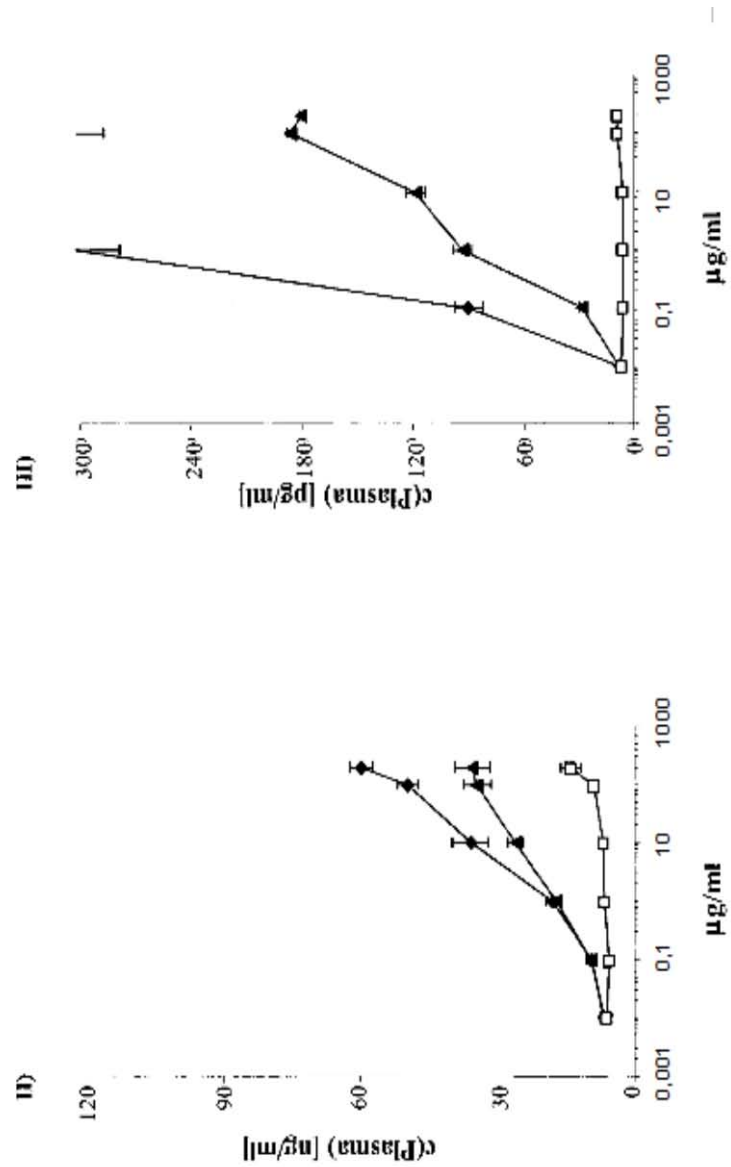


Figura 3K:

Figura 4A:

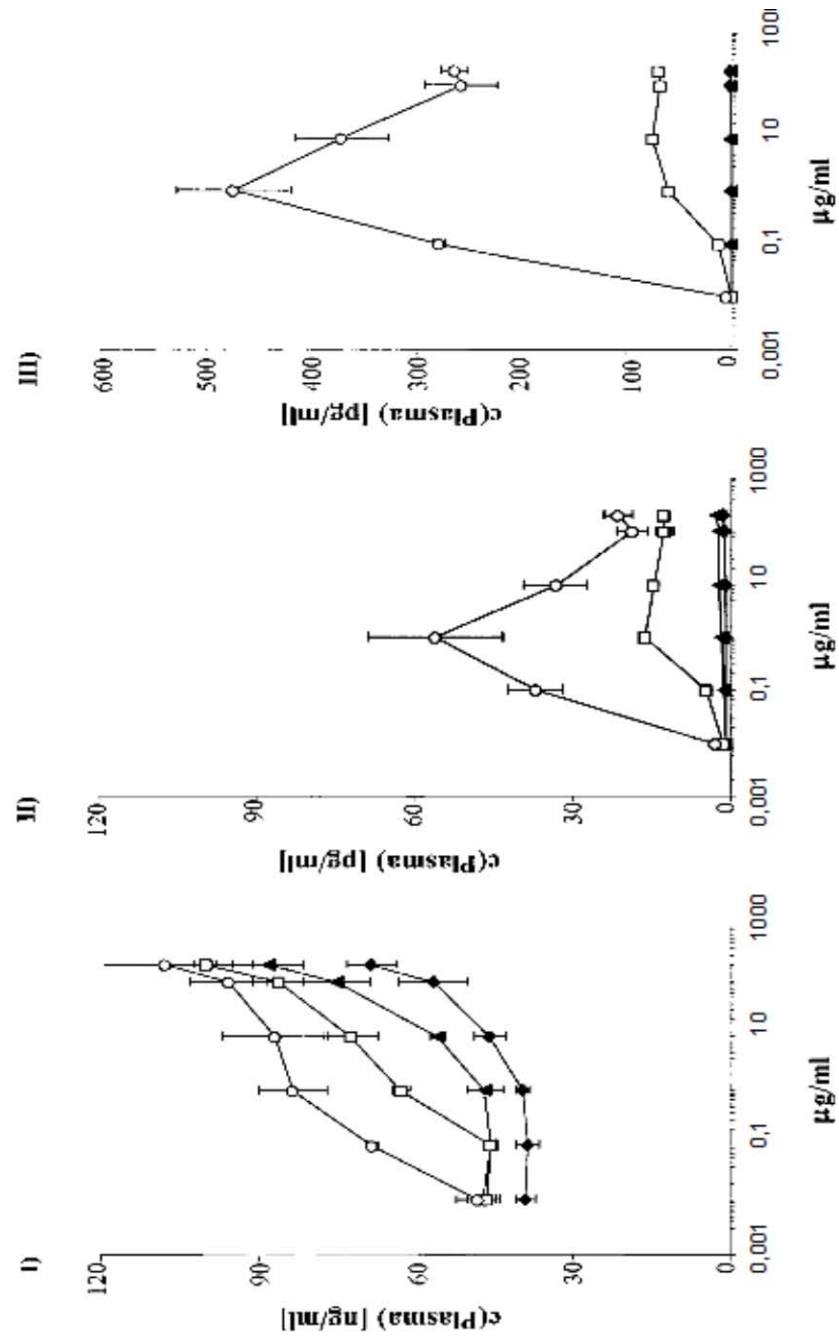


Figura 4B:

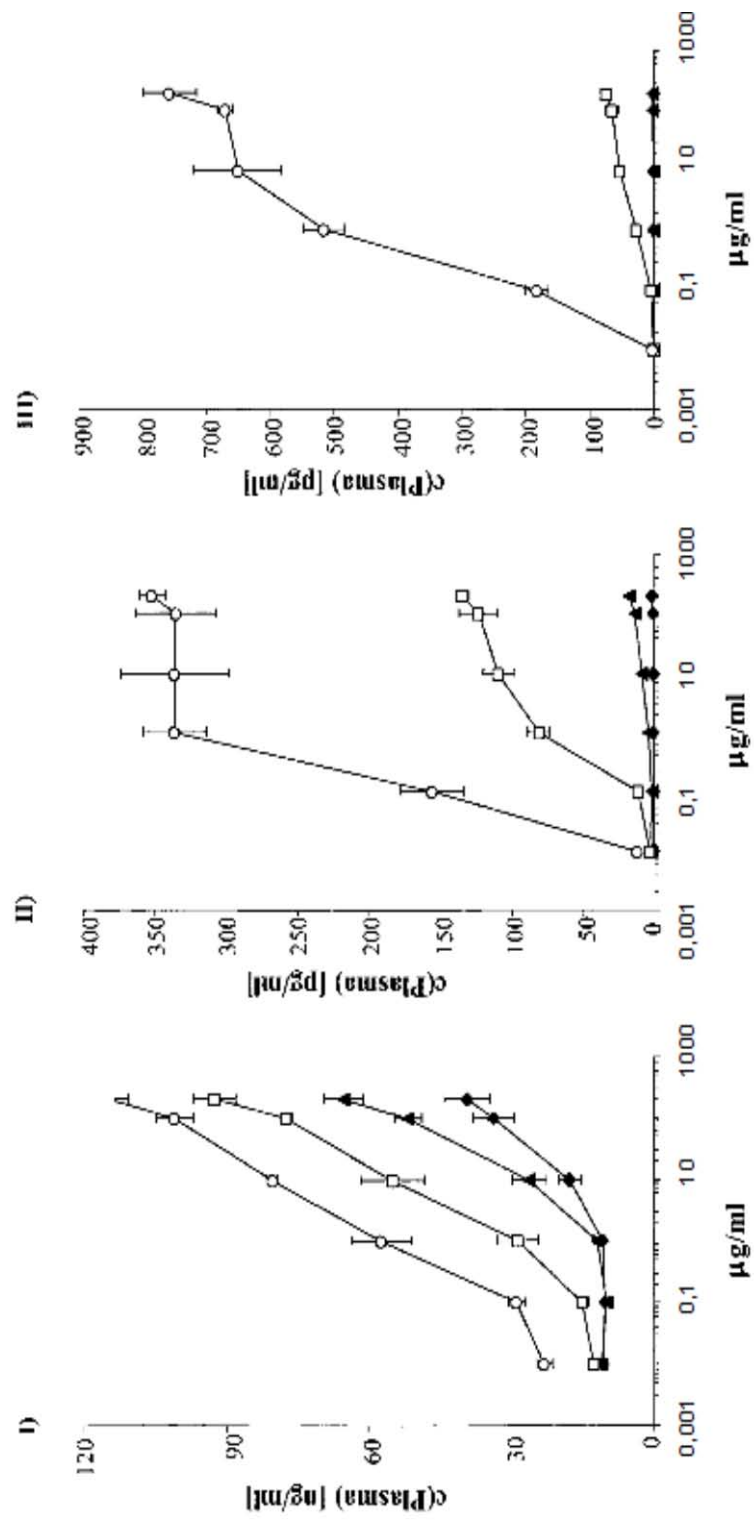
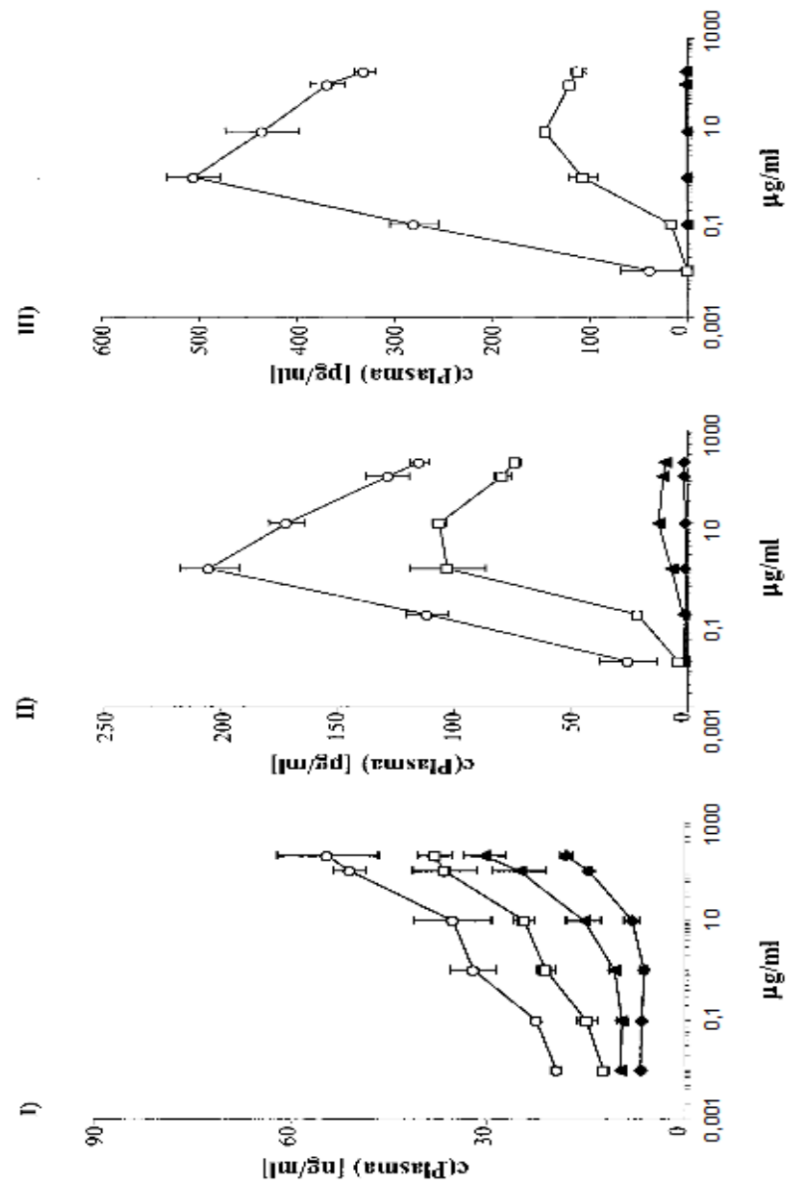


Figura 4C:



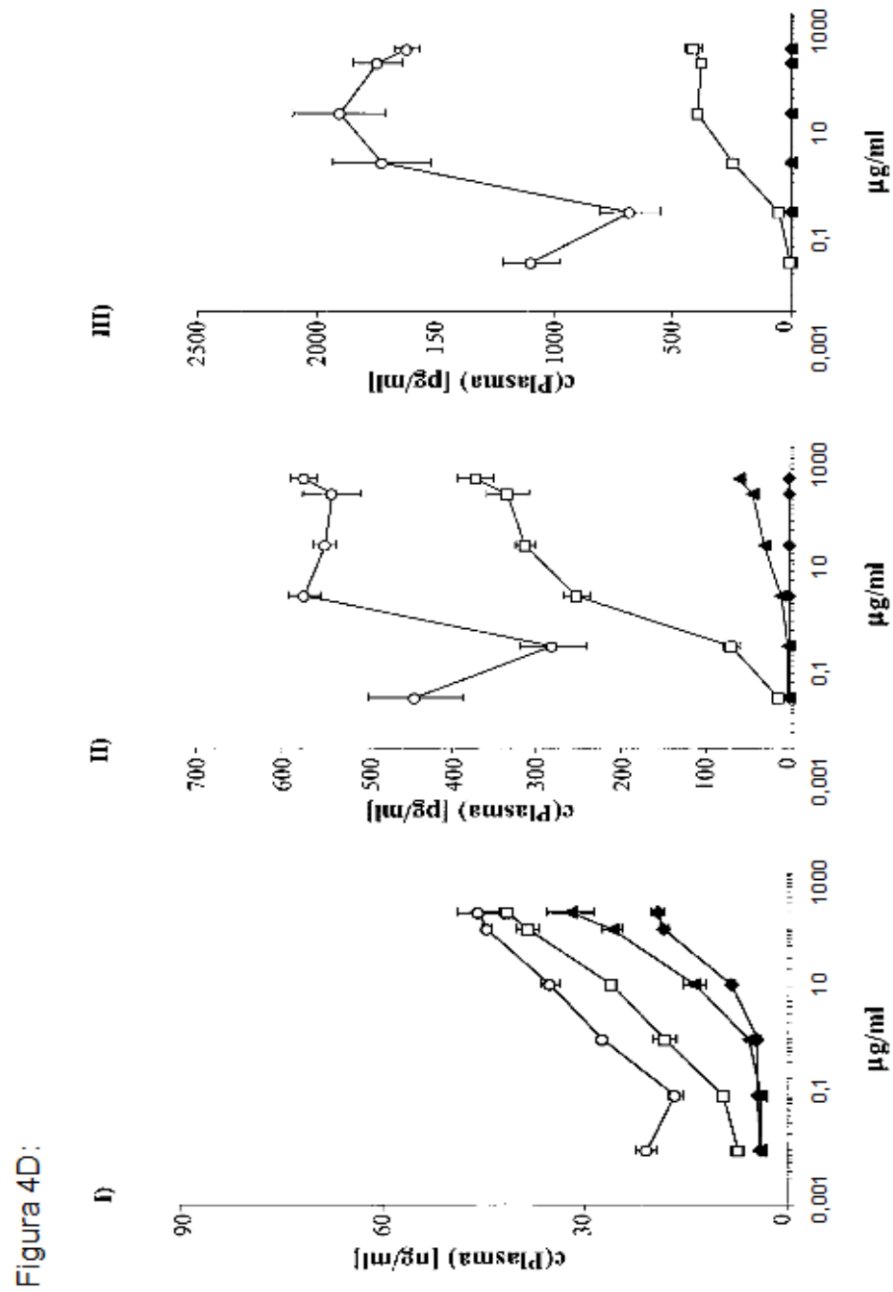


Figura 4E:

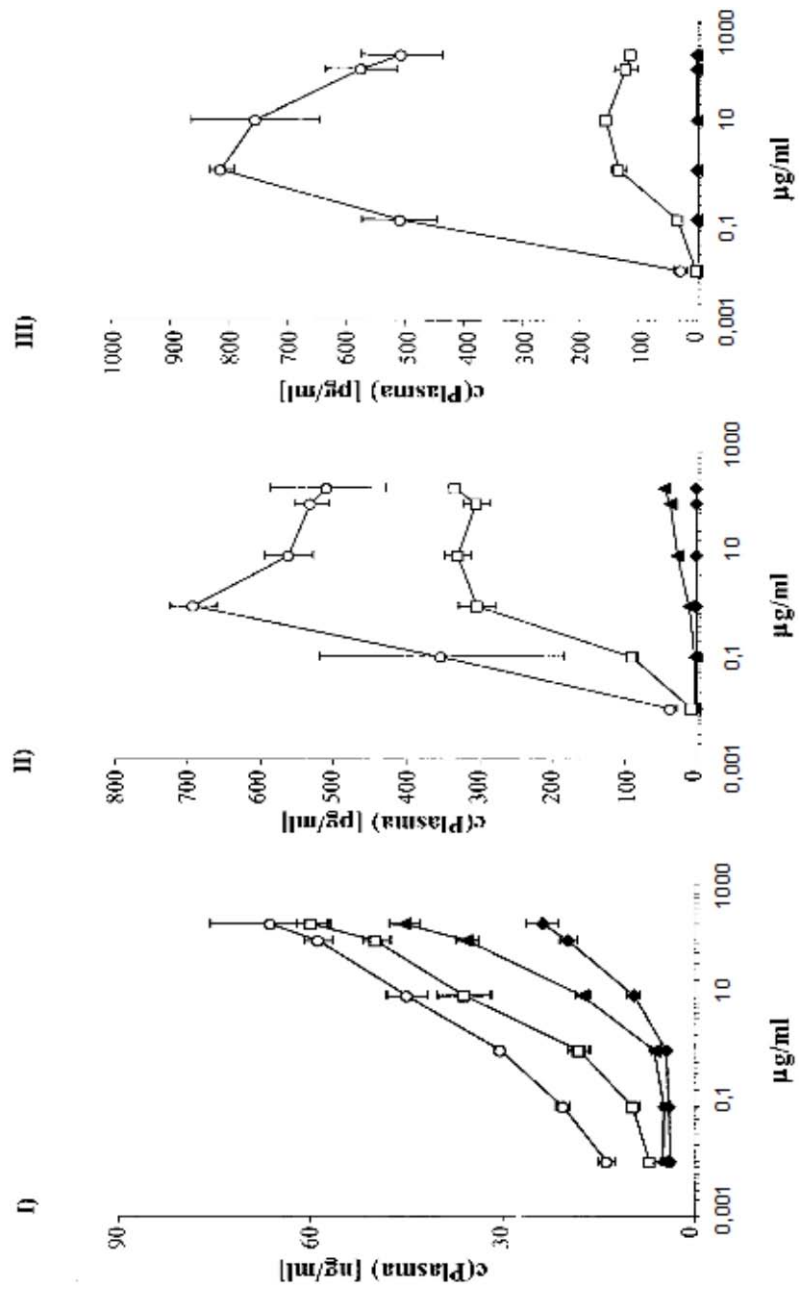


Figura 5A:

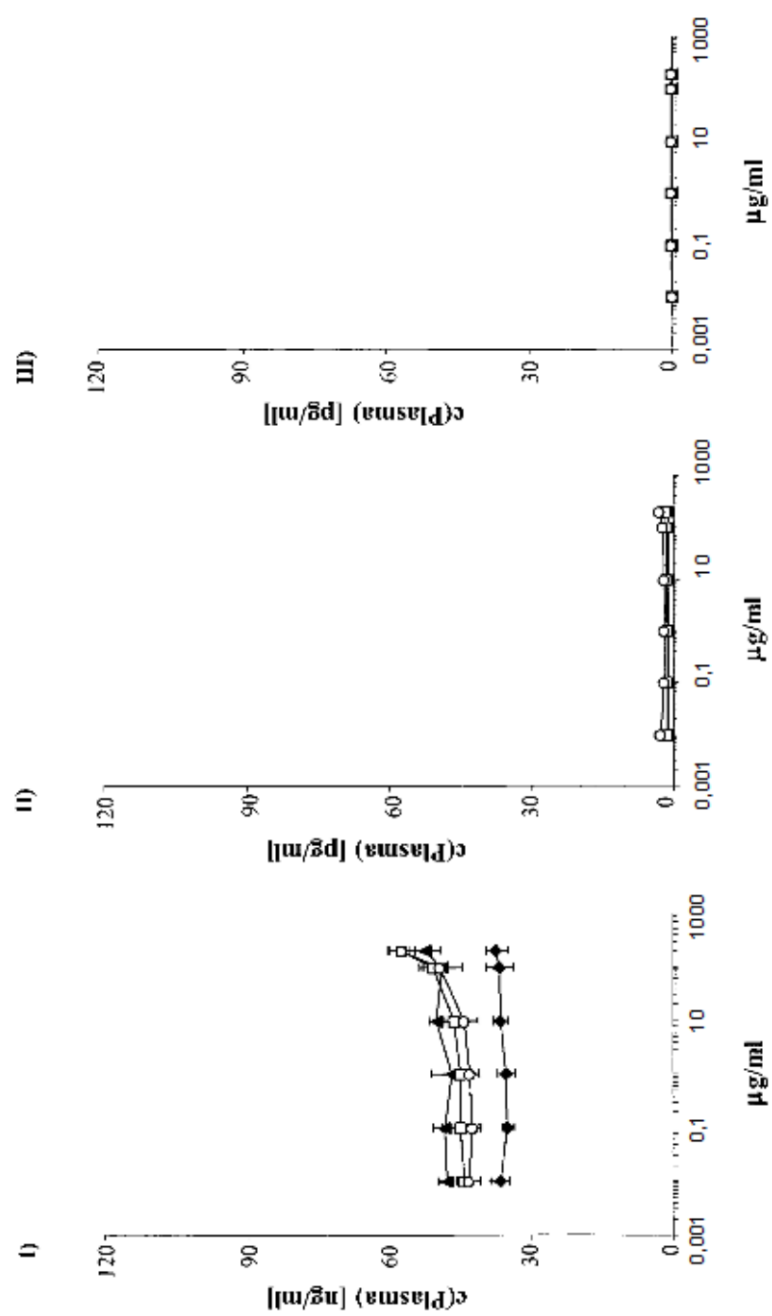


Figura 5B:

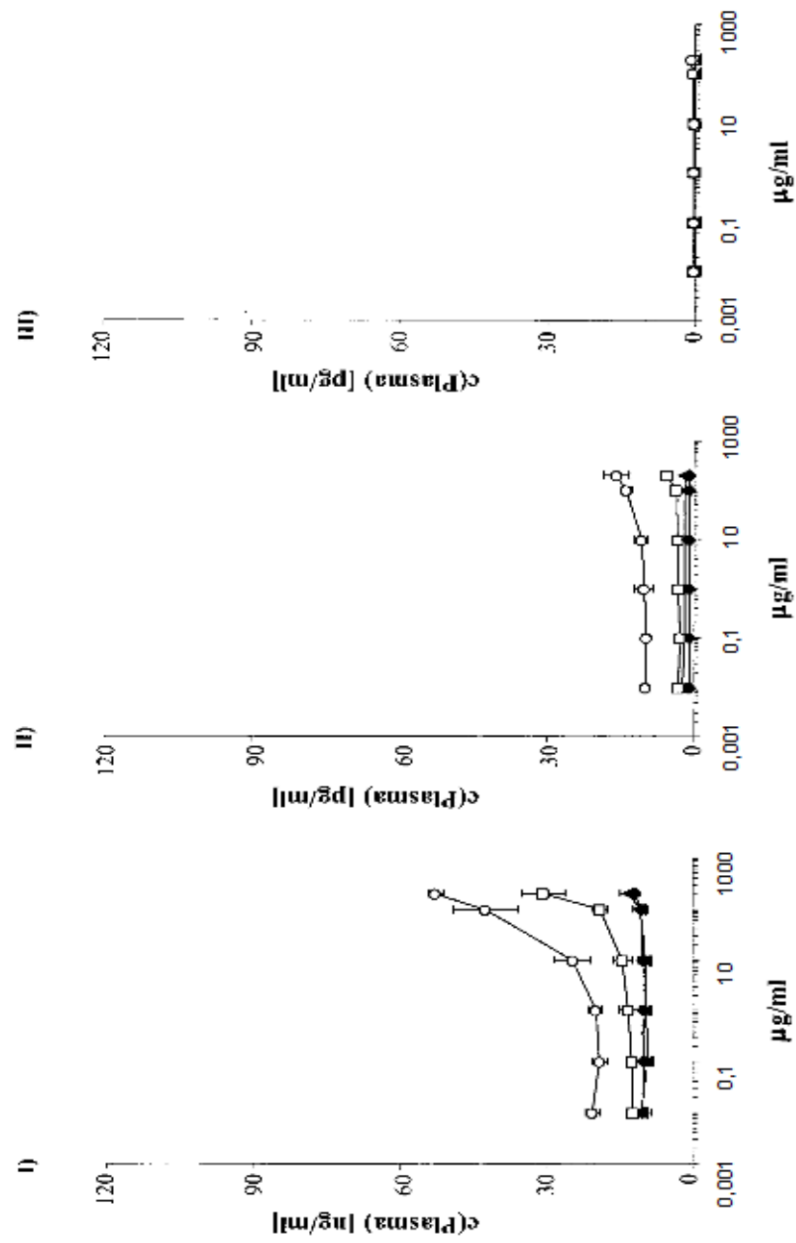


Figura 5C:

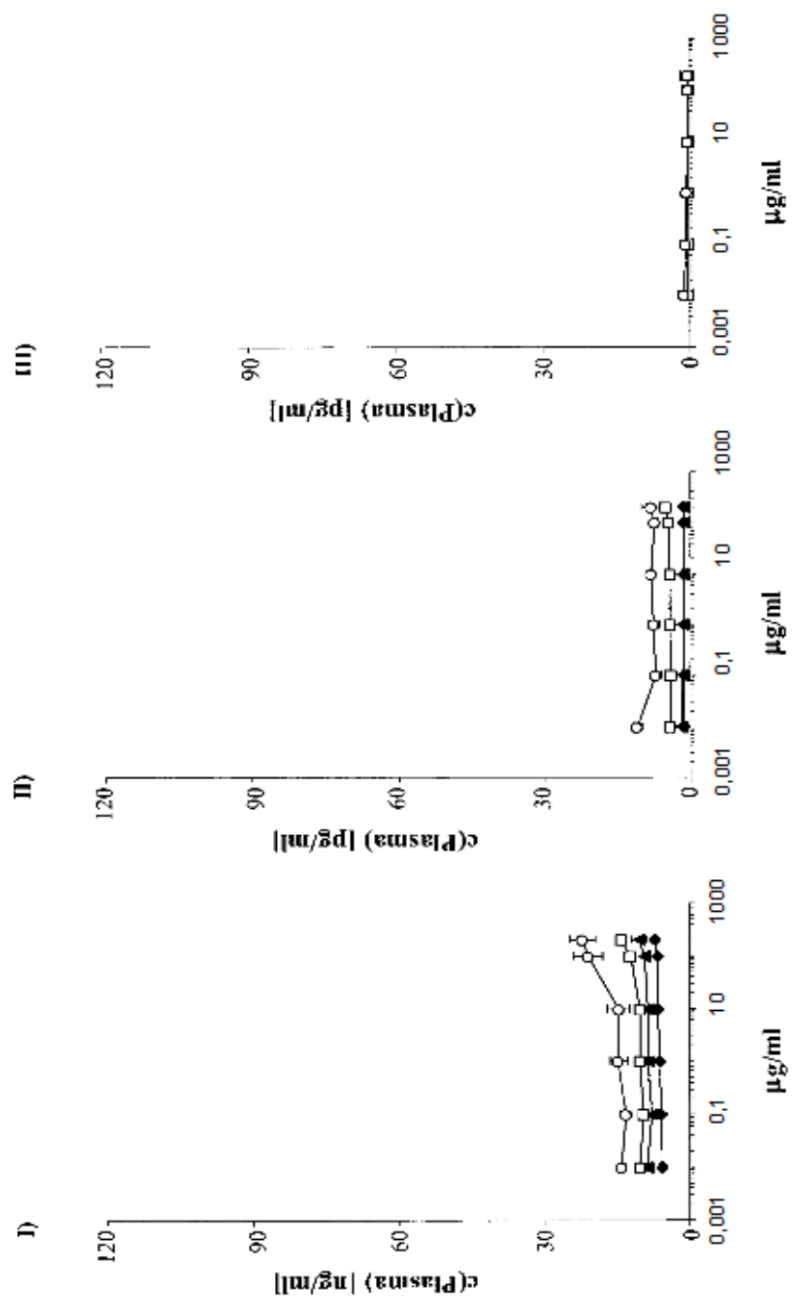


Figura 5D:

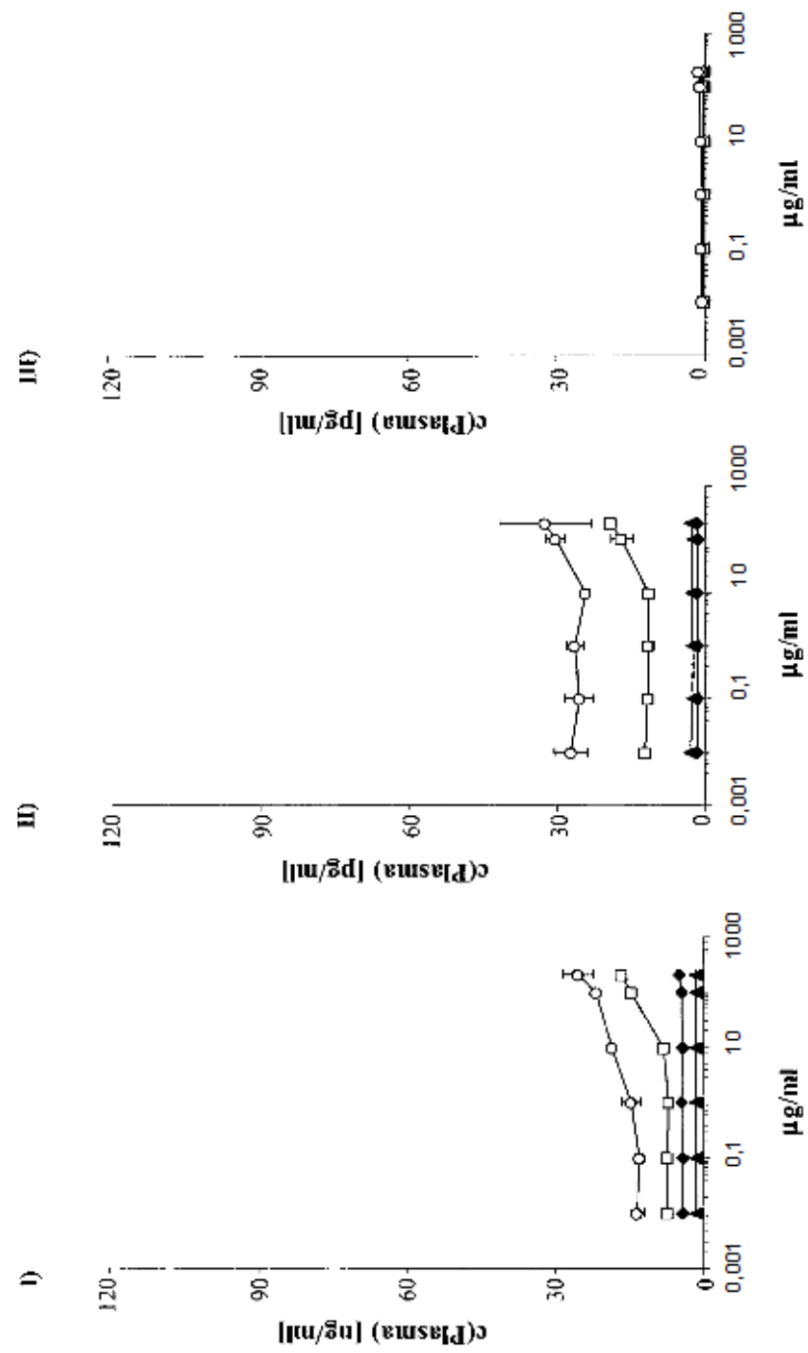


Figura 5E:

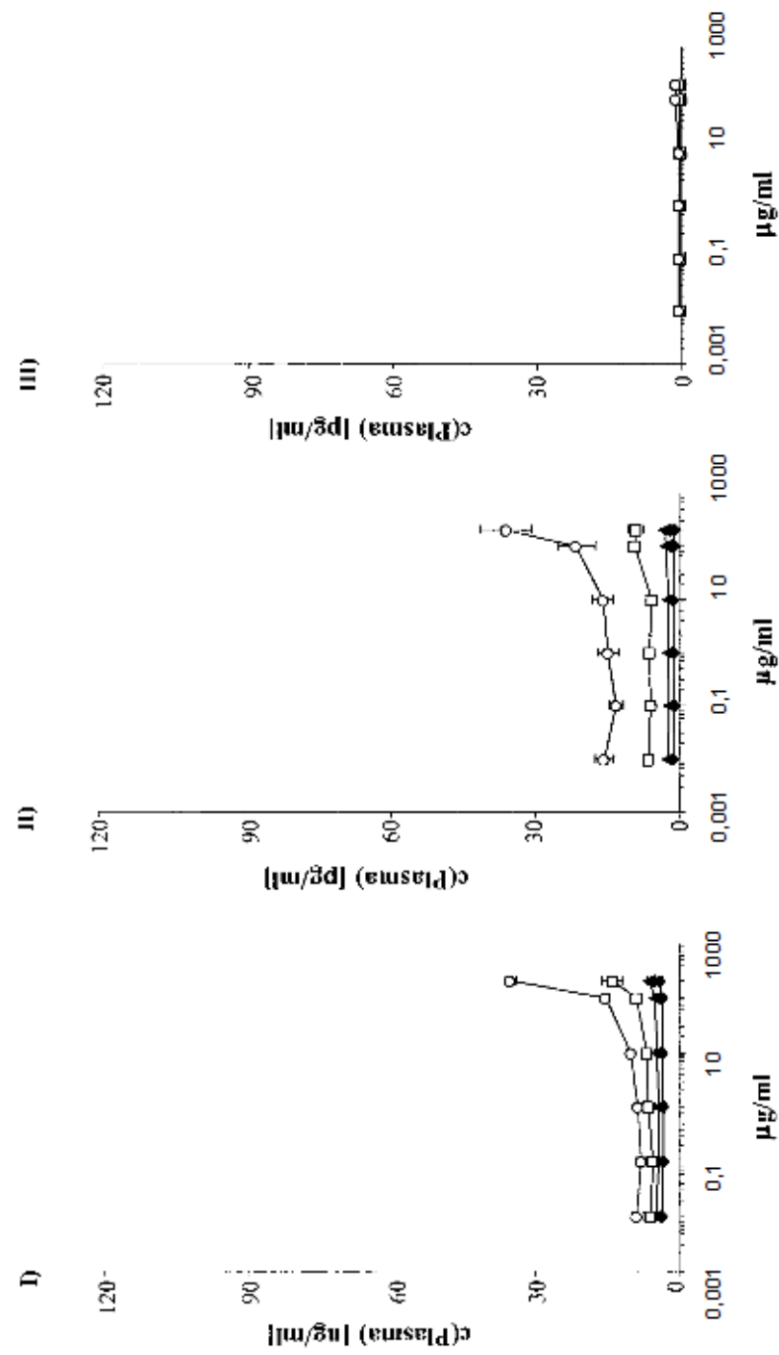


Figura 6A:

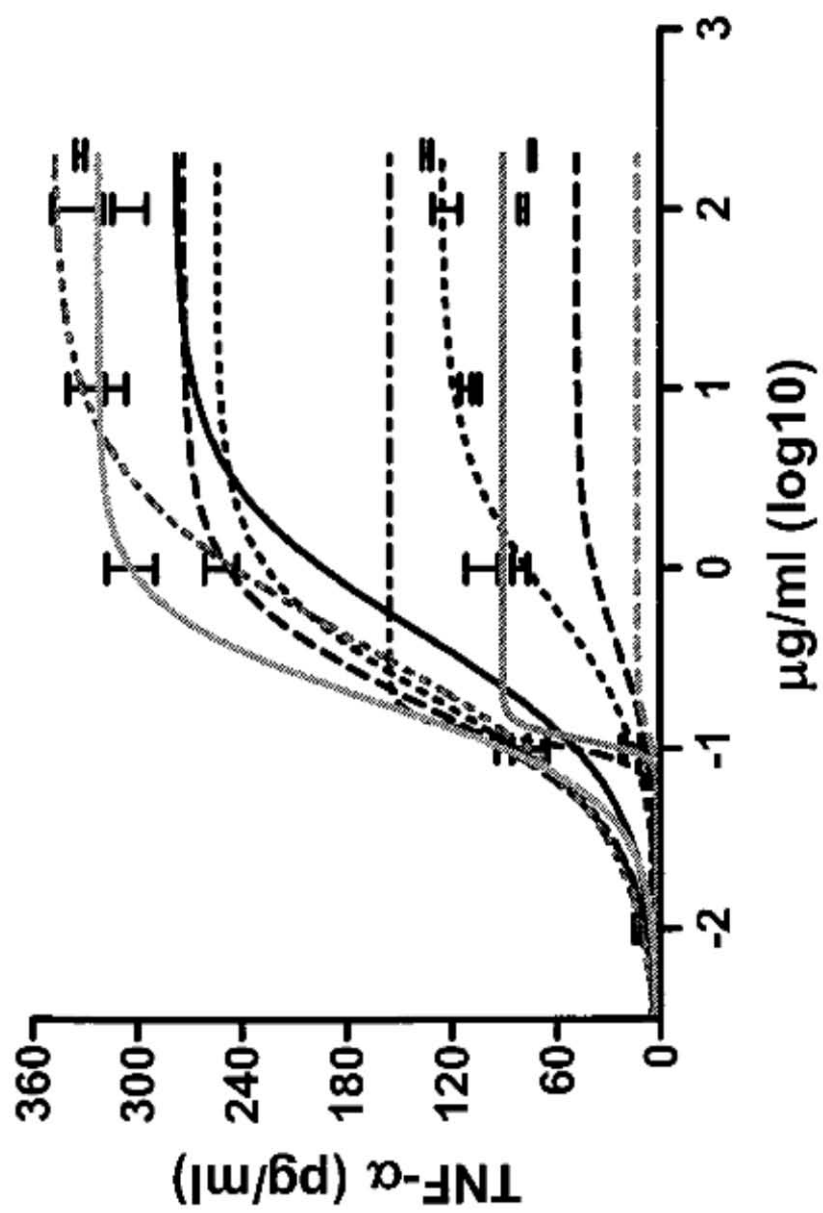


Figura 6B:

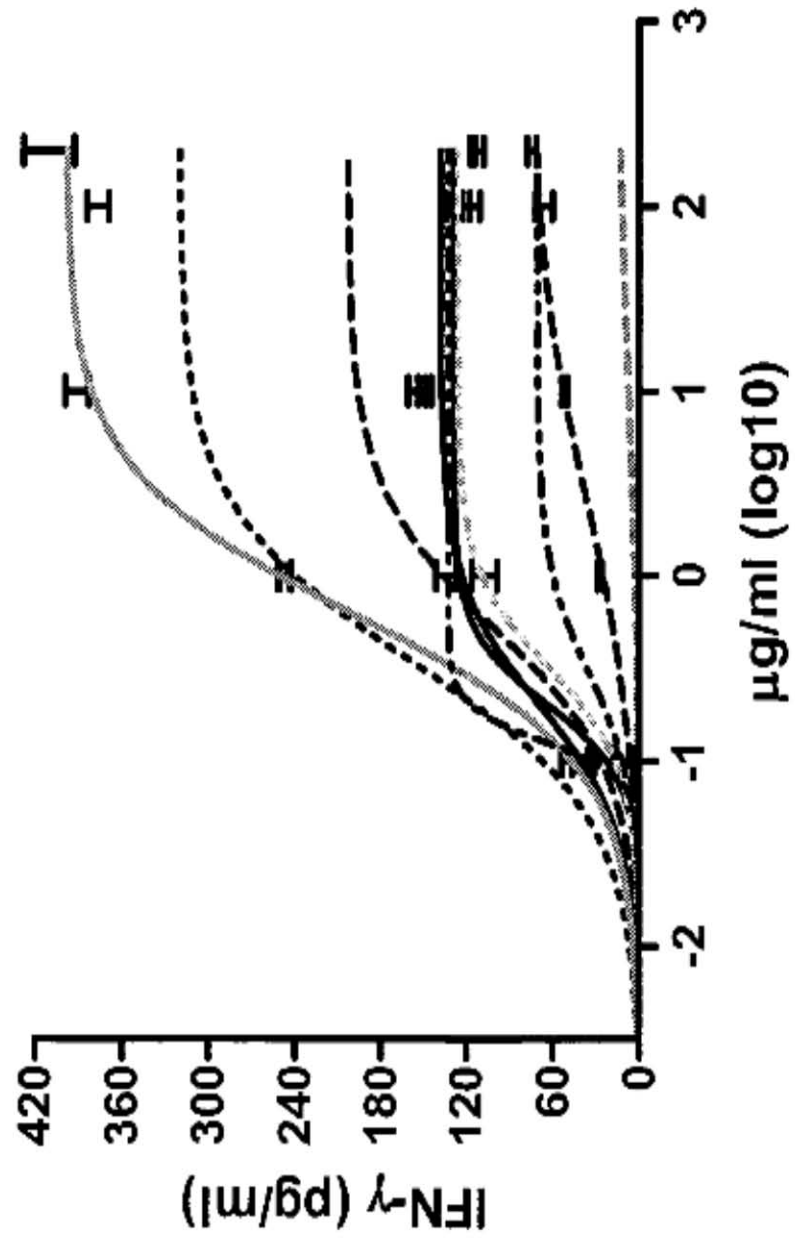
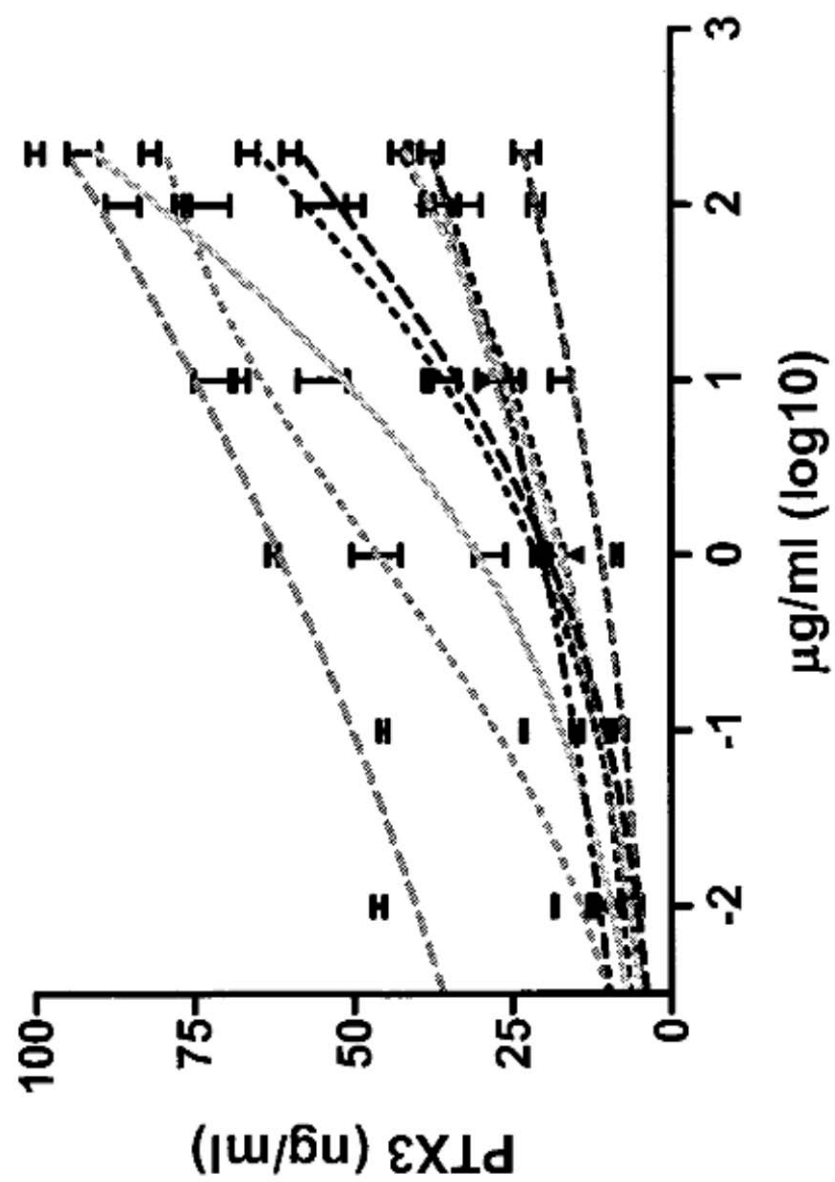


Figura 6C:



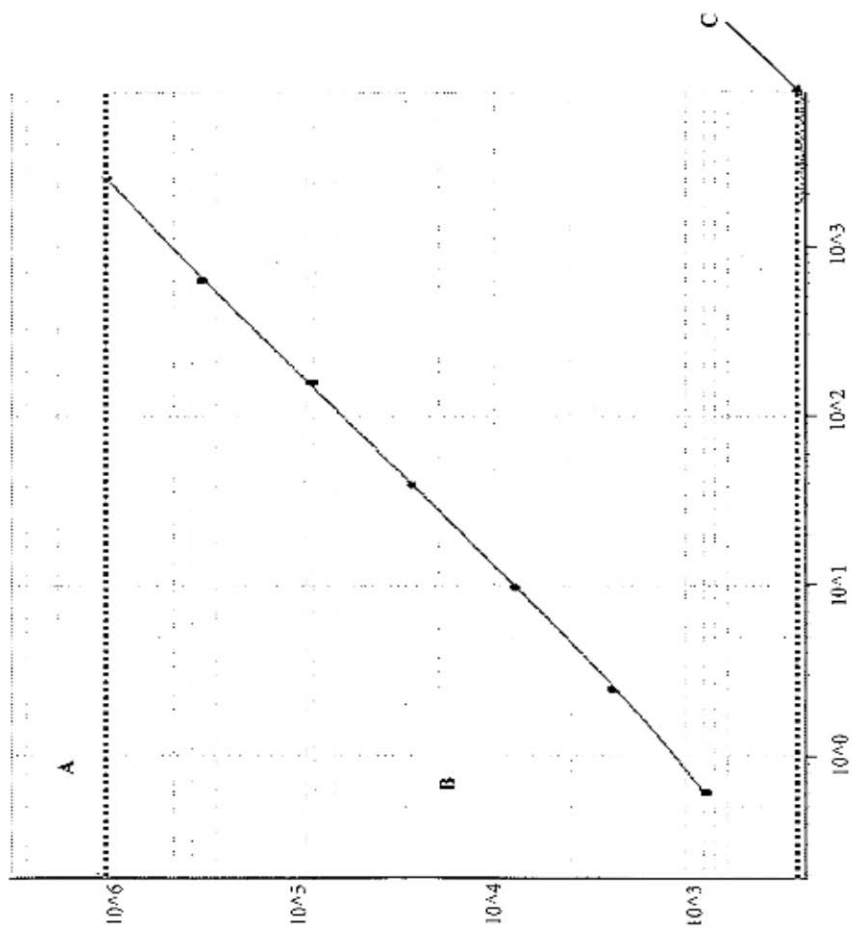


Figura 7:

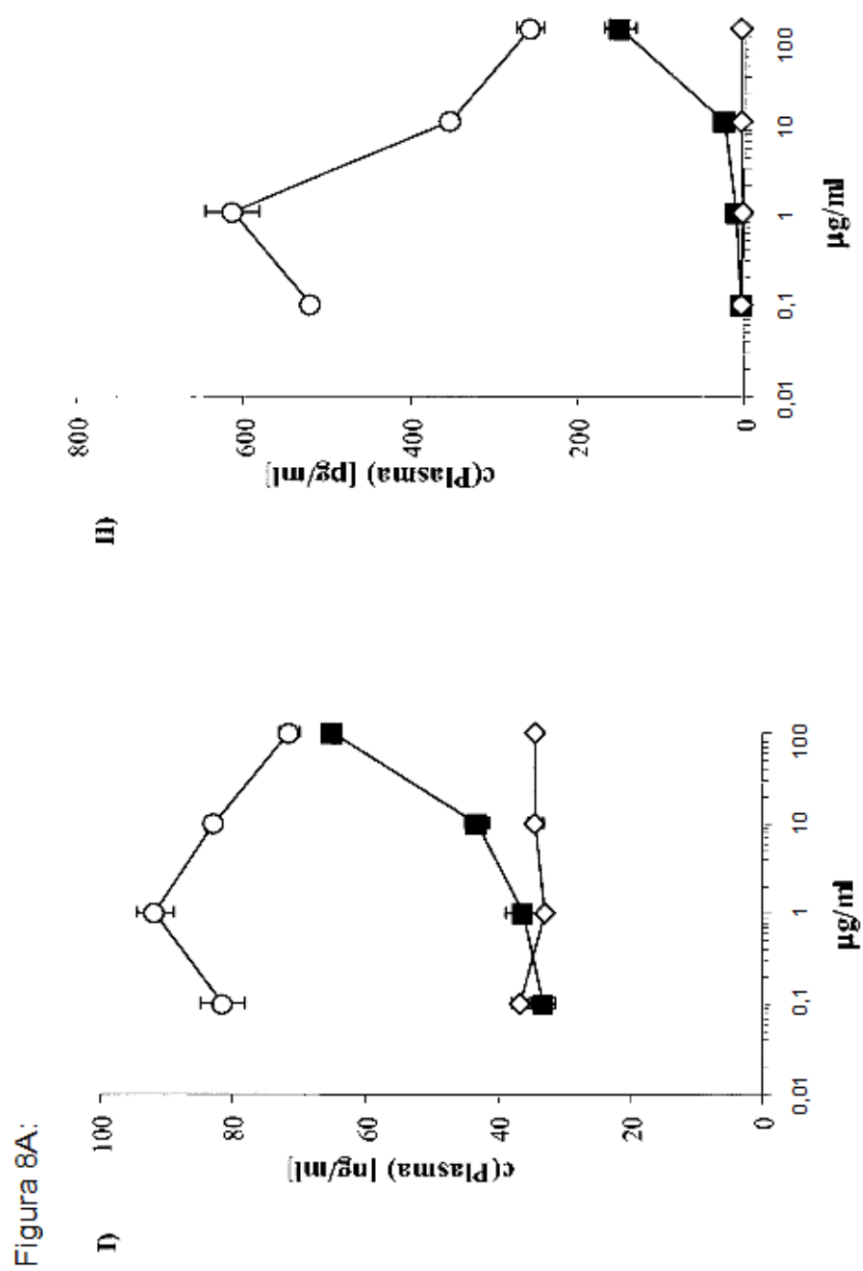


Figura 8B:

