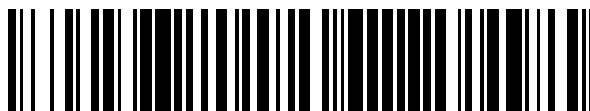


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 597**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011** **E 11802739 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2656075**

54 Título: **Procedimiento para optimizar el tratamiento de pacientes con fármacos biológicos**

30 Prioridad:

22.12.2010 EP 10382346

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.01.2015

73 Titular/es:

PROTEOMIKA, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Vizcaya, 504
48160 Derio - Bizkaia, ES

72 Inventor/es:

NAGORE CASAS, DANIEL;
RUIZ DEL AGUA, AINHOA;
MARTÍNEZ MARTÍNEZ, ANTONIO y
SIMÓN BUELA, LAUREANO

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 526 597 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para optimizar el tratamiento de pacientes con fármacos biológicos

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al sector de la terapia personalizada y, en particular, a un procedimiento para clasificar a un paciente que padece artritis reumatoide como un paciente que responde o que no responde a un tratamiento basado en un fármaco biológico seleccionado entre infliximab y adalimumab.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La utilización de fármacos biológicos se ha incrementado durante los últimos años. Por ejemplo, los anticuerpos neutralizantes de TNF-alfa están siendo utilizados cada vez más para tratar enfermedades con un fuerte trasfondo inflamatorio como artritis reumatoide (AR) y enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Las enfermedades inflamatorias crónicas representan un grupo de afecciones heterogéneas caracterizadas por una elevada producción de citoquinas, moléculas que son esenciales para la respuesta inmunitaria de un organismo, que desempeñan un papel crítico en la patología de estas enfermedades. Entre las muchas citoquinas, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa) es un agente clave debido a su papel en el inicio de la cascada de procesos inflamatorios y, de este modo, para desencadenar el desarrollo de síntomas de la enfermedad en individuos que padecen una enfermedad inflamatoria.

La última generación de fármacos biológicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias se basa en construcciones de anticuerpos que ejercen su efecto uniéndose a TNF-alfa, bloqueando de este modo el inicio de la cascada inflamatoria. Aunque potencialmente muy eficaz, la utilización de estos fármacos requiere que la respuesta del paciente al tratamiento sea monitorizada estrechamente, si fuera necesario, para guiar el régimen de tratamiento.

En la práctica, la respuesta al tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias se monitoriza en base a una serie de variables clínicas que reflejan aspectos del proceso de la enfermedad. Incrementar la uniformidad y consistencia de procedimientos utilizados para medir la respuesta del paciente al tratamiento con fármacos biológicos anti-TNF-alfa ayudará a optimizar la dosificación y contribuirá a una mejor utilización de costosos productos terapéuticos por los profesionales sanitarios a beneficio de sus pacientes. Ruiz del Agua y otros (Journal of Translational Medicine 2010, 8, Supl 1: P32) da a conocer la monitorización de tratamientos con infliximab y adalimumab en AR. Da a conocer que los pacientes que responden al tratamiento tienen concentraciones de anticuerpos anti-fármaco mayores y de fármacos menores que los que no responden al tratamiento. Sugiere la monitorización regular de fármacos circulantes y sus respectivos ADA en pacientes para hacer una utilización racional de dichos fármacos.

Debido a su estructura y naturaleza, los fármacos biológicos anti-TNF-alfa son altamente inmunógenos. Desafortunadamente una respuesta inmunitaria en el paciente contra fármacos biológicos puede reducir drásticamente la eficacia del tratamiento.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de procedimientos adecuados para la determinación de la respuesta del paciente a un tratamiento basado en un fármaco biológico que sean más específicos que los procedimientos convencionales y, particularmente, de procedimientos adecuados para determinar la respuesta de un paciente que padece artritis reumatoide a un tratamiento basado en un fármaco biológico anti-TNF-alfa seleccionado entre infliximab y adalimumab.

50 DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Perfiles de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infliximab a lo largo de un año de tratamiento (parte superior). Se muestran los valores promedio para el grupo de pacientes que no muestran respuesta a infliximab. Δ DAS28 está indicado para cada tiempo de infusión (parte inferior). Δ DAS28 no se incrementa a lo largo del año de tratamiento (parte inferior). La línea horizontal en el panel inferior indica el umbral Δ DAS28 = 1,2.

Figura 2. Perfiles de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infliximab a lo largo de un año de tratamiento (parte superior). Se muestran los valores promedio para el grupo de pacientes que muestran respuesta a infliximab. Δ DAS28 está indicado para cada tiempo de infusión (parte inferior). Δ DAS28 no se incrementa a lo largo del año de tratamiento (parte inferior). La línea horizontal en el panel inferior indica el umbral Δ DAS28 = 1,2.

Figura 3. DAS28 en función de las variables de biodisponibilidad (concentración de infliximab) y capacidad inmunógena (anticuerpo contra infliximab).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

El término “anticuerpo” (también conocido como inmunoglobulinas, abreviado Ig), tal como se utiliza en el presente documento, está destinado a proteínas gamma-globulinas que se encuentran en la sangre u otros fluidos corporales de vertebrados, y que pueden unirse a una diana de manera específica. Estos están, habitualmente, constituidos por unidades estructurales básicas, cada una con dos grandes cadenas pesadas y dos pequeñas cadenas ligeras, para formar, por ejemplo, monómeros con una unidad, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades. Los anticuerpos que pueden utilizarse en la presente invención como fármacos biológicos, dirigidos a diferentes dianas, son productos comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por el experto en la materia. También pueden utilizarse fragmentos de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo tal como, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv, diacuerpos, etc. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos pero, más recientemente, estos fragmentos pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes. La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y sigue siendo capaz de reticular el antígeno. “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada CHI que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo. Un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) comprende los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL).

Por “terapia (o tratamiento) anti-TNF-alfa (o “anti-TNF-α” o “anti-TNF-α” o simplemente “anti-TNF”)” se entiende la administración a un paciente de un fármaco biológico o molécula biológica (biofarmacéutico) capaz de bloquear, inhibir, neutralizar, prevenir la unión al receptor, o prevenir la activación de TNFR por TNF-alfa. El TNFR (“receptor del factor de necrosis tumoral”), o receptor de muerte, es un receptor de citoquina que se une a factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF-alfa) (Locksley RM, y otros 2001. Cell 104 (4): 487-501). Los ejemplos ilustrativos no limitantes de dichos fármacos biológicos incluyen anticuerpos inhibidores contra TNF-alfa así como compuestos, diferentes de anticuerpos, capaces de unirse a TNF-alfa, por ejemplo, proteínas, péptidos, pequeñas moléculas químicas, etc.

La expresión “fármaco biológico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia preparada u obtenida a partir de un organismo vivo o sus productos que se utiliza en la prevención, el diagnóstico o el tratamiento de una patología, por ejemplo, una patología humana, como anticuerpos tales como anticuerpos similares a IgG, fragmentos Fab, etc.; por lo tanto, un fármaco biológico o biofarmacéutico es un fármaco médico producido utilizando biotecnología, por ejemplo, una proteína (incluyendo anticuerpos), un ácido nucleico (ADN, ARN u oligonucleótidos antisentido), utilizados para fines terapéuticos o de diagnóstico *in vivo* y, generalmente, son producidos por medios diferentes de la extracción directa de una fuente biológica nativa (sin manipular).

El término “dosis” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se utiliza en el presente documento para significar una cantidad suficiente para prevenir y, preferentemente, reducir, como mínimo, en aproximadamente el 25 por ciento, más preferentemente, como mínimo, en el 50 por ciento, de la forma más preferente, como mínimo, en el 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en una característica de patología. En relación con la presente invención, el término también puede significar una cantidad suficiente para mejorar o invertir uno o más síntomas asociados con una enfermedad.

Por “artritis reumatoide” o “AR” se entiende un trastorno inflamatorio sistémico crónico que puede afectar a muchos tejidos y órganos, pero que ataca principalmente a las articulaciones sinoviales. El proceso produce una respuesta inflamatoria del sinovio (sinovitis) secundaria a hiperplasia de células sinoviales, exceso de líquido sinovial y el desarrollo de *pannus* en el sinovio. La patología del proceso de la enfermedad a menudo conduce a la destrucción de cartílago articular y anquilosis de las articulaciones. La artritis reumatoide también puede producir inflamación difusa en los pulmones, el pericardio, la pleura y la esclerótica, y también lesiones nodulares, de la forma más habitual en tejido subcutáneo bajo la piel. Aunque se desconoce la causa de AR, la autoinmunidad desempeña un papel crucial tanto en su cronicidad como en su progresión, y la AR está considerada como una enfermedad autoinmunitaria sistémica.

El término “paciente”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, aunque sin limitarse a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferentemente, el paciente es un ser humano varón o mujer de cualquier edad o raza.

El término “muestra”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier muestra que puede obtenerse del paciente, concretamente, una muestra susceptible de contener anticuerpos. Por lo tanto, el presente procedimiento puede aplicarse a prácticamente cualquier tipo de muestra biológica de un paciente, tal como una muestra de biopsia, tejido, célula o fluido, por ejemplo, sangre, extractos cerebrales, líquido cefalorraquídeo (LCR), leche, moco, plasma, saliva, semen, suero, esputo, sudor, lágrimas y similares. En una realización particular, dicha muestra se selecciona entre sangre, plasma o suero.

El término “TNF-alfa” (abreviado en el presente documento como “TNF- α ”, “TNFa” o simplemente “TNF”), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una citoquina humana que existe como una forma secretada de 17 kD y una forma asociada a membrana de 26 kD, cuya forma biológicamente activa se compone de un trímero de moléculas de 17 kD unidas de forma no covalente. La secuencia de TNF-alfa humano se muestra en CAA26669.1 (SEQ ID NO: 1). El término “TNF-alfa”, tal como se utiliza en el presente documento, no solamente incluye el gen y la proteína humanos sino también sus ortólogos de otras especies tales como perros, ratones, ratas, etc., así como variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

Procedimiento de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto ahora que una concentración específica de un fármaco biológico circulante (por ejemplo, infliximab, adalimumab, etc.) junto con, opcionalmente, una concentración específica de anticuerpos para dicho fármaco biológico (anticuerpos anti-fármaco biológico), particularmente tal como se determina en una muestra de sangre de un paciente, dicho paciente padeciendo artritis reumatoide y siendo tratado con dicho fármaco biológico, está asociada con la respuesta del paciente al tratamiento con dicho fármaco biológico.

Esta información permitiría a los facultativos (médicos) seguir más estrechamente la respuesta de sus pacientes al tratamiento y tomar decisiones informadas sobre el tratamiento. Se ha validado clínicamente que estas variables biológicas muestran utilidad en la correlación de tanto los niveles de fármacos biológicos circulantes como los niveles de anticuerpos contra dichos fármacos biológicos con la eficacia del tratamiento en base a la Puntuación de Actividad de la Enfermedad (DAS28) del paciente utilizada para realizar el seguimiento de la enfermedad en pacientes.

La presente invención es un procedimiento, tal como se define mediante la reivindicación independiente 1. Realizaciones adicionales se definen en las reivindicaciones dependientes.

En el procedimiento de la presente invención, la patología es artritis reumatoide. El paciente se somete a un tratamiento anti-TNF-alfa que comprende la administración a dicho paciente de un fármaco biológico seleccionado entre el grupo que comprende infliximab y adalimumab que es administrado periódicamente mediante administraciones repetitivas, siendo capaz dicho fármaco biológico de bloquear, inhibir, neutralizar, prevenir la unión al receptor, o prevenir la activación del TNFR por TNF-alfa.

El procedimiento de la presente invención permite clasificar a un paciente como un paciente que responde o que no responde a un tratamiento, comprendiendo dicho tratamiento la administración a dicho paciente de un fármaco biológico seleccionado entre infliximab y adalimumab que es administrado periódicamente mediante administraciones repetitivas, en el que dicho paciente padece artritis reumatoide que es tratable con dicho fármaco biológico en dicho tratamiento y en el que dicho paciente ha recibido, como mínimo, una dosis de dicho fármaco biológico.

Según el procedimiento de la presente invención, la concentración del fármaco biológico circulante en una muestra del paciente en estudio se determina en un tiempo t1, en el que dicho tiempo t1 corresponde a un punto temporal dentro del periodo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de dicho fármaco biológico (etapa a del procedimiento de la reivindicación 1). Esta etapa pretende determinar la biodisponibilidad del fármaco biológico administrado al paciente en estudio.

El término “t1” corresponde a un punto temporal dentro del periodo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de dicho fármaco biológico al paciente. El periodo de tiempo entre dos administraciones sucesivas, en lo sucesivo denominado como “periodo de tiempo ti-tj”, puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, dicho periodo de tiempo puede comprender, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o incluso más días; habitualmente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 o incluso más meses. En una realización particular, t1 es un punto temporal en la primera mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj; en otra realización particular, t1 es un punto temporal en la segunda mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj; y, en otra realización particular, t1 es un punto temporal alrededor de la mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj. A modo de ilustración, el periodo de tiempo ti-tj puede ser de 4 semanas y t1 puede ser un punto temporal dentro de la primera mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj (por ejemplo, el día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 después del día de la anterior administración (ti)); como alternativa, el periodo de tiempo ti-tj puede ser de 4 semanas y t1 puede ser un punto temporal dentro de la segunda mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj (por

ejemplo, el día 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 después del día de la anterior administración (ti)); o, como alternativa, el periodo de tiempo ti-tj puede ser de 4 semanas y t1 puede ser un punto temporal alrededor de la mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj (por ejemplo, el día 13, 14, 15, 16, ó 17 después del día de la anterior administración (ti)). En una realización particular, dicho periodo de tiempo ti-tj es de 4 semanas y t1 es un punto temporal dentro de la segunda mitad de dicho periodo de tiempo ti-tj, es decir, dentro de las dos últimas semanas de dicho periodo de tiempo ti-tj, preferentemente dentro de la última semana de dicho periodo de tiempo ti-tj, más preferentemente 6, 5, 4 ó 3 días antes del día de la siguiente administración (tj).

La dosis precisa que se administrará al paciente dependerá, entre otras características, de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno a tratar, y debe decidirse según la valoración del facultativo y las necesidades del paciente. Generalmente, el fármaco biológico es administrado al paciente que necesita tratamiento a una dosis de aproximadamente 0,005 mg por kilogramo de peso corporal a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal; habitualmente la dosis varía entre aproximadamente 0,5 mg por kilogramo de peso corporal y aproximadamente 15 mg por kilogramo de peso corporal. En una realización preferente, la dosis está entre 3 y 5 mg/kg por vía intravenosa. En otra realización preferente, la dosis es de aproximadamente 0,7 mg/kg por vía subcutánea.

La expresión “fármaco biológico circulante”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al fármaco biológico que está presente en un fluido del cuerpo del paciente (por ejemplo, sangre, suero, leche, etc.) y puede detectarse utilizando procedimientos estándar.

El fármaco biológico del procedimiento de la presente invención es infliximab o adalimumab. La concentración de un anticuerpo puede determinarse mediante prácticamente cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, tal como un inmunoensayo, por ejemplo, un ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas), ELISA Utilizando Corrección por Pendiente, RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA en sándwich con doble anticuerpo), ELISA puente, técnicas basadas en la utilización de micromatrices de proteínas o anticuerpos, tecnologías basadas en micropartículas discretas, ensayos basados en la precipitación de oro coloidal, técnicas de cromatografía por afinidad, ensayos de unión a ligando, ensayos de unión a lectina, biosensores, etc., preferentemente mediante un inmunoensayo. En una realización particular, la concentración de los anticuerpos circulantes (fármaco biológico) se mide mediante un ELISA, tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención.

En una segunda etapa (etapa 2 del procedimiento de la reivindicación 1), el procedimiento de la presente invención comprende determinar la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico en una muestra de dicho paciente en dicho tiempo t1. Esta etapa pretende determinar la capacidad inmunógena del fármaco biológico administrado al paciente en estudio. Los ejemplos 1 y 2 de la presente invención muestran un procedimiento que incluye dicha etapa. Esta etapa no es necesaria para clasificar a un paciente como que responde o que no responde a un fármaco biológico, dado que es suficiente determinar los niveles de concentración del fármaco biológico circulante en una muestra de dicho paciente para obtener una buena correlación con la respuesta clínica. Esto se muestra en los ejemplos 3 y 4 de la presente invención.

La expresión “anticuerpo contra un fármaco biológico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier anticuerpo que produce el sistema inmunológico del paciente tratado con dicho fármaco biológico que se une específicamente a dicho fármaco biológico. Los tipos de anticuerpos incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La concentración de anticuerpos contra un fármaco biológico puede medirse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, por ejemplo, un inmunoensayo, por ejemplo, ELISA, ELISA Utilizando Corrección por Pendiente, RIA, EIA competitivo, DAS-ELISA, ELISA puente, técnicas basadas en la utilización de micromatrices de anticuerpos, etc., tal como se ha descrito anteriormente. En una realización particular, la concentración de los anticuerpos contra un fármaco biológico se mide mediante un ELISA, tal como se muestra en los ejemplos 1 y 2 de la presente invención.

Si una baja cantidad de anticuerpos contra un fármaco biológico están presentes en la muestra, estos pueden complejarse con el fármaco biológico y, por lo tanto, no serían detectados en la determinación de los anticuerpos contra el fármaco biológico (es decir, determinación de la capacidad inmunógena). Éste es un fenómeno llamado “interferencia del fármaco”. Para medir el valor cuantitativo de anticuerpos en presencia de complejos fármaco-anticuerpo, los complejos pueden disgregarse utilizando, por ejemplo, un protocolo de disociación con ácido. En una realización particular, las muestras pueden tratarse con un ácido (por ejemplo, ácido acético) antes de realizar la determinación de la capacidad inmunógena, tal como se menciona en los ejemplos adjuntos.

En la tercera etapa (etapa c del procedimiento de la reivindicación 1), el procedimiento de la presente invención comprende comparar la concentración del fármaco biológico circulante en dicho t1 con un valor de referencia 1 (VR1) y la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico en dicho tiempo t1 con un valor de referencia 2 (VR2), en el que VR1 es un valor límite de eficacia terapéutica de la concentración del fármaco biológico circulante, y VR2 es el valor límite de la concentración de dicho anticuerpo contra el fármaco biológico según lo determinado en un grupo de individuos que nunca han recibido tratamiento mediante el mismo ensayo que el utilizado para determinar la concentración del anticuerpo contra el fármaco biológico en la etapa b) de dicha

realización particular).

La expresión “valor límite de eficacia terapéutica de la concentración del fármaco biológico circulante” (VR1), tal como se ha definido anteriormente, se refiere a la concentración del fármaco biológico que está disponible en la sangre circulante para la cual no se mide ningún valor cuantitativo positivo de anticuerpo contra el fármaco biológico en la misma muestra. La expresión “ningún valor cuantitativo positivo”, tal como se utiliza en el presente documento, es equivalente a un valor por debajo de VR2, estando el término “VR2” definido a continuación, es decir, el valor límite de la determinación de la capacidad inmunógena según lo determinado en un grupo de individuos que nunca han recibido tratamiento mediante el mismo ensayo que el utilizado para determinar la concentración del anticuerpo contra el fármaco biológico en la etapa 2) [es decir, si la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico se mide mediante un ensayo ELISA convencional en la etapa 2), la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico en el grupo de individuos que nunca han recibido tratamiento también se determina en las mismas condiciones utilizando el mismo ensayo ELISA convencional]. Para generar VR1, idealmente se utilizan las concentraciones del fármaco biológico circulante en un grupo de pacientes tratados con el fármaco biológico. Preferentemente se utilizan, como mínimo, 2, más preferentemente 2, 3, 10, 20, 40, 100 o incluso más pacientes.

En el procedimiento de la presente invención, el fármaco biológico es infliximab y VR1 es 1,5 µg/ml, o el fármaco biológico es adalimumab y VR1 es 0,8 µg/ml.

La expresión “valor límite de la concentración de dicho anticuerpo contra el fármaco biológico según lo determinado en un grupo de individuos que nunca han recibido tratamiento mediante el mismo ensayo que el utilizado para determinar la concentración del anticuerpo contra el fármaco biológico en la etapa 2)” (VR2) se entiende en la presente invención el valor que define las mediciones de fondo del ensayo utilizado para determinar la concentración del anticuerpo contra el fármaco biológico en la etapa 2), lo que significa que, por encima de dicho valor, las mediciones son auténticos valores positivos, dado que están por encima del umbral de fondo o ruido del procedimiento utilizado.

La expresión “individuos que no han recibido tratamiento”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a sujetos que son nuevos (neófitos) para la terapia con el fármaco biológico, es decir, que nunca antes fueron tratados con dicha terapia. Por lo tanto, esos sujetos no deben presentar anticuerpos contra el fármaco biológico y, por lo tanto, la concentración medida en un grupo de dichos sujetos podría utilizarse para determinar el valor límite de la determinación de la capacidad inmunógena. El grupo de sujetos que no han recibido tratamiento está formado, preferentemente, por más de 1, preferentemente 2 o más, más preferentemente 3 o más, de la forma más preferente 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, o incluso más individuos que no han recibido tratamiento. El valor límite se calcula entonces como la media de los valores obtenidos de cada uno de los individuos que no han recibido tratamiento.

En una realización particular, el inmunoensayo es un ELISA. En el procedimiento de la presente invención, el fármaco biológico es infliximab y VR2 es 150 ng/ml, o el fármaco biológico es adalimumab y VR2 es 32 ng/ml.

Además, según el procedimiento de la presente invención, si la concentración del fármaco biológico circulante es menor que VR1 y la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico es mayor que VR2, entonces dicho paciente se clasifica como un paciente que no responde a dicho tratamiento/fármaco biológico.

Por el contrario, si a t1, la concentración del fármaco biológico circulante es igual a, o mayor que, VR1 y la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico es igual a VR2, o menor que el mismo, entonces dicho paciente se clasifica como un paciente que responde a dicho tratamiento/fármaco biológico.

La expresión “paciente que responde al tratamiento”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a pacientes para los cuales la respuesta predicha al tratamiento/fármaco biológico es positiva. Análogamente, la expresión “paciente que no responde al tratamiento”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a pacientes para los cuales la respuesta predicha al tratamiento/fármaco biológico es negativa.

La expresión “respuesta predicha” o similar, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la determinación de la probabilidad de que el paciente responda favorable o desfavorablemente a una terapia/fármaco biológico dado. Especialmente, el término “predicción”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una evaluación individual de cualquier parámetro que puede ser útil para determinar la evolución de un paciente. Tal como entenderán los expertos en la materia, no es necesario que la predicción de la respuesta clínica al tratamiento con un fármaco biológico, aunque es preferente que lo sea, sea correcta para el 100% de los sujetos a diagnosticar o evaluar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de sujetos pueda identificarse como que tienen una probabilidad incrementada de tener una respuesta positiva. Si un sujeto es estadísticamente significativo puede determinarse sin esfuerzo adicional por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de los intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en el documento de Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son, como mínimo, el 50%, como mínimo, el 60%, como mínimo, el 70%, como mínimo, el

80%, como mínimo, el 90%, como mínimo, el 95%. Los valores p son, preferentemente, 0,2, 0,1 ó 0,05.

La expresión “respuesta clínica”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la respuesta a un fármaco biológico del sujeto que padece una patología que es tratable con dicho fármaco biológico. Los criterios estándar pueden variar de una enfermedad a otra.

Los pacientes que consiguen una respuesta completa o parcial se consideran como “que responden al tratamiento”, y todos los demás pacientes se consideran como “que no responden al tratamiento”.

La respuesta en pacientes individuales puede caracterizarse como una respuesta completa, una respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva, tal como se entienden estas expresiones en la técnica. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención permite clasificar a un paciente como un paciente que responde o que no responde a un tratamiento, comprendiendo dicho tratamiento la administración a dicho paciente de un fármaco biológico seleccionado entre el grupo que comprende infliximab y adalimumab que es administrado periódicamente mediante administraciones repetitivas, en el que dicho paciente padece artritis reumatoide que es tratable con dicho fármaco biológico en dicho tratamiento y en el que dicho paciente ha recibido, como mínimo, una dosis de dicho fármaco biológico.

En el caso de artritis reumatoide, el estándar utilizado es la determinación de la Puntuación de Actividad de la Enfermedad (DAS28, véase la tabla 1). La DAS28 se determina según la Liga Europea contra las Enfermedades Reumáticas (EULAR) (Aletaha D, y otros 2010. Ann. Rheum. Dis. 69 (9): 1580-8).

En una alternativa del procedimiento de la reivindicación 1, el fármaco biológico es infliximab. El infliximab es un mAb anti-TNF-alfa que puede utilizarse para el tratamiento de, por ejemplo, psoriasis, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, artritis reumatoide y colitis ulcerosa. En otra realización particular, el fármaco biológico es adalimumab. El adalimumab es un inhibidor de TNF-alfa que puede utilizarse para el tratamiento de, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis crónica de moderada a grave y artritis idiopática juvenil. En una realización específica, dicha patología del paciente a tratar mediante un fármaco biológico es artritis reumatoide y dicho fármaco biológico es infliximab, VR1 es 1,5 µg/ml y VR2 es 150 ng/ml (según lo determinado mediante ELISA).

En una alternativa del procedimiento de la reivindicación 1, dicha patología del paciente a tratar mediante un fármaco biológico es artritis reumatoide y dicho fármaco biológico es adalimumab, VR1 es 0,8 µg/ml y VR2 es 32 ng/ml (según lo determinado mediante ELISA).

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no deben considerarse limitantes del alcance de la misma.

EJEMPLOS

Los siguientes procedimientos eran comunes a todos los ejemplos (según sea aplicable).

PROCEDIMIENTOS

Toma de muestras

Se recogieron muestras de sangre de pacientes (ejemplos 1 y 2) antes de cada infusión, y el suero se obtuvo, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C.

Análisis

Una alícuota de cada suero se descongeló. Todos los sueros se pusieron a prueba simultáneamente en busca de la concentración de fármaco biológico libre (biodisponibilidad) y anticuerpos anti-fármaco biológico (capacidad inmunógena).

Análisis de la biodisponibilidad

Se diseñó un inmunoensayo para medir específicamente la concentración del fármaco biológico libre (anticuerpos para TNF-alfa humano infliximab o adalimumab) en los sueros de pacientes. En resumen, una placa de ELISA de 96 pocillos se recubrió con TNF-alfa recombinante humano, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2, mediante un anticuerpo monoclonal murino anti-TNF-alfa. El TNF-alfa recombinante humano se obtuvo en *Escherichia coli*, mediante clonación en un vector de expresión. La proteína se expresó como una proteína de fusión que porta una marca de seis histidinas en su extremo amino y se purificó mediante cromatografía por afinidad.

Los sueros se incubaron en la placa en diferentes diluciones sucesivas y réplicas. Si el fármaco biológico está presente en el suero del paciente, éste se unirá al TNF-alfa fijado. La detección del fármaco biológico unido tiene lugar con un anticuerpo monoclonal biotinilado para dicho fármaco biológico (infliximab o adalimumab). Después de

lavar, la cantidad de anticuerpo biotinilado unido puede medirse incubando con estreptavidina-poliHRP (Fitzgerald Industries Limited), y después de otra etapa de lavado incubando con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), el sustrato para peroxidasa de rábano picante (HRP). Si el resultado es positivo, aparecerá un color azul. La reacción se detiene con HCl, lo que cambia el color azul a amarillo. Este color amarillo puede medirse en un lector de ELISA a 450 nm. En paralelo, se construye una curva patrón de calibración utilizando fármaco biológico puro. Esto correlaciona la concentración del fármaco biológico con una intensidad de absorbancia dada. La concentración de fármaco biológico libre en el suero de cada paciente se obtiene en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de suero mediante extrapolación de la intensidad de absorbancia en la curva de calibración.

10 Análisis estándar de la capacidad inmunógena

Un inmunoensayo puente se diseñó para medir específicamente la concentración de las inmunoglobulinas contra el fármaco biológico en los sueros de pacientes. En resumen, una placa de ELISA de 96 pocillos se recubre con el fármaco biológico. Los sueros se incuban en la placa en diferentes diluciones sucesivas y réplicas. Si están presentes anticuerpos anti-fármaco biológico en el suero del paciente, estos se unirán al fármaco biológico fijado. Finalmente, se añade fármaco biológico biotinilado como reactivo de detección. Si anticuerpos anti-fármaco biológico están presentes en el suero del paciente, el fármaco biológico biotinilado se unirá a ellos. Después del lavado, la cantidad de anticuerpos anti-fármaco biológico puede medirse incubando con estreptavidina-poliHRP, y después de otra etapa de lavado incubando con TMB, el sustrato para HRP. Si el resultado es positivo, aparecerá un color azul. La reacción se detiene con HCl, lo que cambia el color azul a amarillo. Este color amarillo puede medirse en un lector de ELISA a 450 nm. En paralelo, se construye una curva patrón de calibración utilizando diluciones sucesivas de una muestra de suero con concentración conocida de anticuerpos anti-fármaco biológico como control positivo. Esto correlaciona la concentración de los anticuerpos con una intensidad de absorbancia dada. La concentración de anticuerpos en el suero de cada paciente se obtiene en unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml) de suero mediante extrapolación de la intensidad de absorbancia en la curva de calibración. Para fines de cuantificación, en el caso de infliximab, 1 UA/ml corresponde a 10 ng/ml de anticuerpos anti-infliximab y, en el caso de adalimumab, 1 UA/ml corresponde a 4 ng/ml de anticuerpos anti-adalimumab.

30 Análisis de la capacidad inmunógena con protocolo de disociación con ácido

Si una baja cantidad de anticuerpos anti-fármaco biológico están presentes en la muestra, estos pueden complejarse con el fármaco biológico y, por lo tanto, no serían detectados en el análisis de la capacidad inmunógena. Éste es un fenómeno llamado "interferencia del fármaco". Para medir el valor cuantitativo de anticuerpos en presencia de complejos de fármaco biológico-anticuerpo, los complejos se disgregaron utilizando un protocolo de disociación con ácido. Las muestras se trataron con ácido acético antes del análisis, y el análisis de la capacidad inmunógena se llevó a cabo tal como se ha explicado anteriormente.

Determinación de la Puntuación de Actividad de la Enfermedad (DAS28)

40 La Puntuación de Actividad de la Enfermedad fue determinada por el reumatólogo según los criterios de la Liga Europea contra las Enfermedades Reumáticas (EULAR) para cada paciente en cada punto de muestreo (tabla 1). Un valor elevado de DAS28 indica la progresión de la enfermedad. Un valor bajo de DAS28 indica la remisión de la enfermedad.

Tabla 1. Valores límite de DAS28 según la EULAR	
Estado de enfermedad	Intervalos de DAS28
Remisión	<1,6
Baja actividad	<2,4
Actividad moderada	$2,4 \leq \text{DAS28} < 3,7$
Alta actividad	>3,7

45 Clasificación de la respuesta clínica. En pacientes con artritis reumatoide, la respuesta clínica al tratamiento con fármaco biológico se evaluó según el índice DAS28. La definición de que responde y que no responde al tratamiento se evaluó un año después del inicio del tratamiento con el fármaco correspondiente.

50 Según EULAR:

- los pacientes se agruparon como que responden al tratamiento si:

$$\Delta\text{DAS28} = \text{DAS28}_{\text{predosis}} - \text{DAS28}_{1\text{año}} \geq 1,2;$$

55 y

- los pacientes se agruparon como que no responden al tratamiento si:

$$\Delta\text{DAS28} = \text{DAS28}_{\text{predosis}} - \text{DAS28}_{\text{1año}} < 1,2$$

Determinación de valores límite de biodisponibilidad y capacidad inmunógena

Se analizaron muestras predosis de 52 pacientes (infiximab) y 10 pacientes (adalimumab) para calcular el valor límite tanto de la concentración del fármaco biológico (límite de biodisponibilidad) como de la concentración de anticuerpos anti-fármaco biológico (límite de capacidad inmunógena), que se definieron como el promedio de las señales de fondo de todos los sueros predosis más 1,645 veces la desviación estándar de todos los valores.

Determinación de valores de referencia de biodisponibilidad y capacidad inmunógena

Un valor de referencia 1 (VR1) corresponde al umbral de eficacia terapéutica para cada uno de los fármacos biológicos circulantes tal como se detalla en las secciones de "Determinación de los límites de diagnóstico" para infiximab y adalimumab, tal como se muestra en los ejemplos 1 y 2. Un valor de referencia 2 (VR2) corresponde al valor cuantitativo positivo más bajo de anticuerpos contra cada fármaco biológico que puede cuantificarse (expresado en unidades (U) o ng (nanogramos) por mililitro) tal como se detalla en las secciones de "Determinación de los límites de diagnóstico" para infiximab y adalimumab, tal como se muestra en los ejemplos 1 y 2.

Análisis estadístico

Se utilizaron SigmaPlot v11.0 y SPSS v11.0 para análisis de datos. Las muestras no seguían una distribución normal según los prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Por lo tanto, se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis posterior. Se utilizaron Tau de Kendall y Rho de Spearman para estudiar la correlación entre variables. Valores p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

EJEMPLO 1

Correlación de la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de infiximab con la respuesta clínica de pacientes que padecen artritis reumatoide

Sujetos: pacientes con artritis reumatoide (AR), 75, que cumplían los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987 (criterios ACR de 1987) [Arnett F. y otros (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis". Arthritis Rheum. 31 (3): 315-24] y a punto de empezar el tratamiento con infiximab, se inscribieron de forma consecutiva. Se analizaron un total de 612 muestras de suero de dichos 75 pacientes que padecían AR.

Tratamiento: los pacientes recibieron dosis de 3 mg/kg de infiximab (Remicade®) por vía intravenosa. La frecuencia de administración del fármaco era la siguiente: primera infusión el primer día de tratamiento (punto de partida), segunda infusión dos semanas después, tercera infusión un mes después de la segunda, cuarta infusión dos meses después de la tercera, y posteriores infusiones a intervalos de ocho semanas.

Evaluación de la respuesta clínica del paciente: se utilizó la Puntuación de Actividad de la Enfermedad 28 (DAS28) para evaluar la respuesta clínica del paciente según las puntuaciones en la tabla 1. La DAS28 es un procedimiento validado según los criterios de la Liga Europea contra las Enfermedades Reumáticas (EULAR). La respuesta clínica durante un año se determinó tal como se ha explicado anteriormente.

Determinación de la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de infiximab: la tabla 2 resume los valores promedio de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infiximab.

Tabla 2. Promedio de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infiximab. SD: desviación estándar; Cmín: concentración mínima; Cmáx: concentración máxima.								
Muestras	Biodisponibilidad de Infiximab (µg/ml)				Capacidad inmunógena (anticuerpos contra infiximab) (UA/ml)			
	Promedio	SD	Cmín	Cmáx	Promedio	SD	Cmín	Cmáx
612	4,27	7,39	0,002	54,4	437,47	2490,69	1,000	45904,64

Además, la tabla 3 resume los valores promedio de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infiximab en función del tratamiento.

Tabla 3. Promedio de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infliximab en función del tratamiento.										
SD: desviación estándar; Cmín: concentración mínima; Cmáx: concentración máxima; N, número de pacientes.										
Número de infusión	Biodisponibilidad de Infliximab (µg/ml)					Capacidad inmunógena (anticuerpos contra infliximab) (UA/ml)				
	Promedio	SD	Cmín	Cmáx	N	Promedio	SD	Cmín	Cmáx	N
0	0,002	0,000	0,002	0,002	35	1,00	0,00	1,00	1,00	35
1	23,17	9,67	5,05	48,59	36	1,00	0,00	1,00	1,00	36
2	11,31	9,34	0,002	38,99	37	1,91	3,30	1,00	15,00	37
3	2,87	3,95	0,002	14,87	34	42,50	130,26	1,00	718,92	34
4	1,58	2,57	0,002	11,88	29	200,68	477,53	1,00	1665,90	29
5	1,82	3,41	0,002	13,52	25	479,24	1705,36	1,00	8458,88	25
6	2,81	3,78	0,002	13,13	22	460,31	1226,83	1,00	4606,24	22
7	2,61	4,00	0,002	15,40	18	791,14	2224,35	1,00	9607,56	18
8	3,56	4,81	0,002	14,35	14	1516,52	5666,53	1,00	21204,28	14

Las tablas 4-6 proporcionan valores individuales de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infliximab en función del tratamiento para cada paciente.

Tabla 4. Valores individuales de infliximab circulante (IFX) y capacidad inmunógena (anticuerpos). Se muestran los números de infusión 0 a 3.											
Número de infusión 0			Número de infusión 1			Número de infusión 2			Número de infusión 3		
Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)
1	0,002	1,000	1	21,514	1,000	1	3,966	1,000	4	0,002	15,000
5	0,002	1,000	4	24,828	1,000	4	6,414	1,000	7	1,529	1,000
6	0,002	1,000	5	30,143	1,000	5	19,442	1,000	8	4,278	1,000
7	0,002	1,000	6	5,331	1,000	6	3,317	1,000			
8	0,002	1,000	7	29,050	1,000	7	8,713	1,000	14	0,002	718,918
12	0,002	1,000	8	30,607	1,000	8	13,349	1,000	17	0,002	1,000
16	0,002	1,000	12	48,589	1,000	12	27,184	1,000	18	3,830	1,000
17	0,002	1,000	14	22,375	1,000	14	0,002	1,000	19	0,002	209,533
18	0,002	1,000	16	19,727	1,000	16	15,343	1,000	20	0,002	1,000
19	0,002	1,000	17	30,149	1,000	17	0,461	1,000	21	14,059	1,000
20	0,002	1,000	19	5,046	1,000	18	9,170	1,000	23	0,002	15,000
21	0,002	1,000	20	20,684	1,000	19	0,002	6,585	24	3,187	1,000
22	0,002	1,000	23	30,993	1,000	20	4,987	1,000	27	2,192	1,000
23	0,002	1,000	24	26,668	1,000	21	38,988	1,000	29	3,331	1,000
24	0,002	1,000	27	37,440	1,000	23	6,196	1,000	31	0,002	15,000
27	0,002	1,000	29	37,448	1,000	24	17,797	1,000	33	4,742	1,000
29	0,002	1,000	31	23,707	1,000	27	13,983	1,000	35	0,002	99,345
31	0,002	1,000	33	34,567	1,000	29	26,635	1,000	44	0,002	15,000
33	0,002	1,000	35	11,389	1,000	31	0,310	1,000	60	0,002	15,000
35	0,002	1,000	37	15,527	1,000	33	15,530	1,000	66	1,084	1,000
37	0,002	1,000	44	14,028	1,000	35	0,002	15,000	68	10,586	1,000
44	0,002	1,000	66	33,058	1,000	37	15,689	1,000	71	3,045	1,000
66	0,002	1,000	71	34,340	1,000	44	1,702	1,000	87	1,064	1,000

(continuación)

Tabla 4. Valores individuales de infliximab circulante (IFX) y capacidad inmunógena (anticuerpos). Se muestran los números de infusión 0 a 3.

Número de infusión 0			Número de infusión 1			Número de infusión 2			Número de infusión 3		
Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)
71	0,002	1,000	87	27,373	1,000	66	15,629	1,000	91	0,002	209,960
87	0,002	1,000	91	12,255	1,000	71	28,048	1,000	95	0,212	1,000
91	0,002	1,000	95	16,452	1,000	87	11,475	1,000	110	14,867	1,000
110	0,002	1,000	110	26,161	1,000	91	0,002	15,000	125	4,984	1,000
125	0,002	1,000	125	17,282	1,000	95	8,843	1,000	137	0,002	33,923
137	0,002	1,000	137	30,077	1,000	125	18,549	1,000	138	8,768	1,000
138	0,002	1,000	138	16,817	1,000	137	12,262	1,000	151	5,334	1,000
151	0,002	1,000	151	14,821	1,000	138	13,075	1,000	157	4,634	1,000
157	0,002	1,000	157	18,985	1,000	151	18,129	1,000	168	0,002	11,185
172	0,002	1,000	168	10,657	1,000	157	19,052	1,000	172	3,128	1,000
177	0,002	1,000	172	17,258	1,000	168	2,105	1,000	177	0,002	65,310
179	0,002	1,000	177	15,448	1,000	172	10,360	1,000	179	2,775	1,000
			179	23,144	1,000	177	1,433	1,000			
						179	10,228	1,000			

Tabla 5. Valores individuales de infliximab circulante (IFX) y capacidad inmunógena (anticuerpos). Se muestran los números de infusión 4 a 7.											
Número de infusión 4			Número de infusión 5			Número de infusión 6			Número de infusión 7		
Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)
4	0,002	112,763	7	0,002	13,645	7	0,002	14,555	8	1,457	1,000
6	0,002	31,175	8	6,421	1,000	8	0,384	1,000	19	0,002	9607,560
7	0,040	1,000	18	0,002	1,000	19	0,002	4606,240	27	0,002	1,000
8	1,233	1,000	19	0,002	1676,180	27	0,002	35,580	29	2,255	1,000
14	0,002	1559,520	27	0,930	1,000	31	0,002	935,160	31	0,002	1352,732
17	0,002	200,373	29	0,807	1,000	33	12,269	1,000	33	8,662	1,000
18	4,579	1,000	31	0,002	297,668	44	0,002	15,000	44	0,002	15,000
19	0,002	1450,960	33	13,520	1,000	60	2,688	1,000	60	0,040	1,000
21	6,254	1,000	35	0,002	15,000	65	1,879	1,000	65	2,664	1,000
23	0,002	1,000	37	0,002	992,080	66	2,160	1,000	66	3,117	1,000
24	2,191	1,000	44	0,002	281,540	68	13,129	1,000	68	15,403	1,000
27	1,022	1,000	60	0,040	1,000	71	6,121	1,000	91	0,002	2985,120
29	0,731	1,000	66	0,911	1,000	87	0,954	1,000	95	0,002	15,000
31	0,002	117,420	68	9,977	1,000	91	0,002	3675,520	110	3,451	1,000
33	2,567	1,000	71	3,388	1,000	95	0,002	1,000	125	2,805	1,000
37	0,002	264,788	87	0,002	1,000	110	5,709	1,000	139	6,230	1,000
44	0,002	1665,900	91	0,002	8458,880	125	3,564	1,000	168	0,002	253,072
45	0,040	1,000	95	0,002	82,568	137	0,002	15,000	172	1,037	1,000
66	1,122	1,000	110	3,515	1,000	239	2,533	1,000			
68	11,877	1,000	125	2,875	1,000	157	3,114	1,000			
71	3,647	1,000	137	0,002	15,655	168	0,002	815,853			
87	1,229	1,000	139	0,332	1,000	172	2,956	1,000			
91	0,002	306,800	157	2,047	1,000						

(continuación)

Tabla 5. Valores individuales de infliximab circulante (IFX) y capacidad inmunógena (anticuerpos). Se muestran los números de infusión 4 a 7.

Número de infusión 4			Número de infusión 5			Número de infusión 6			Número de infusión 7		
Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)	Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)
95	0,119	1,000	168	0,002	132,660						
110	2,735	1,000	172	0,807	1,000						
125	1,485	1,000									
157	3,796	1,000									
168	0,002	91,153									
172	1,085	1,000									

Tabla 6. Valores individuales de infliximab circulante (IFX) y capacidad inmunógena (anticuerpos). Se muestra el número de infusión 8

Número de infusión 8		
Paciente	IFX (µg/ml)	Anticuerpos (UA/ml)
19	0,002	21204,280
27	0,298	1,000
29	2,057	1,000
33	14,348	1,000
44	0,002	15,000
54	0,298	1,000
60	5,181	1,000
65	6,815	1,000
66	1,861	1,000
68	13,291	1,000
95	0,426	1,000
110	1,780	1,000
139	3,466	1,000
168	0,040	1,000

Después del análisis de las muestras, se observó la siguiente distribución para infliximab (tabla 7).

Tabla 7. Distribución de pacientes según diferentes combinaciones de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infliximab.

Biodisponibilidad/capacidad inmunógena	Pacientes*	Muestras
positiva/negativa	68	390
negativa/positiva	35	142
negativa/negativa	51	80
positiva/negativa	0	0

*Debido al múltiple número de muestras por paciente, los pacientes pueden estar presentes en más de un grupo.

- 5 La figura 1 muestra los perfiles de biodisponibilidad y capacidad inmunógena promedio durante un año de tratamiento de todos los pacientes que no responden al tratamiento con infliximab. En este ejemplo se muestra que Δ DAS28 es menor que 1,2; por lo tanto, los pacientes se clasifican como que no responden al tratamiento con infliximab. De forma concomitante con la presencia de anticuerpos contra infliximab, la concentración de infliximab libre cae por debajo del valor límite.

- 10 La figura 2 muestra los perfiles de biodisponibilidad y capacidad inmunógena promedio durante un año de tratamiento de los pacientes que responden al tratamiento con infliximab. En este ejemplo se muestra que Δ DAS28 es mayor que 1,2; por lo tanto, el paciente se clasifica como que responde al tratamiento con infliximab. De forma concomitante con la presencia de anticuerpos contra infliximab, la concentración de infliximab libre cae por debajo del valor límite.

15 Correlación de biodisponibilidad y capacidad inmunógena: La biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de infliximab se correlacionan fuertemente ($p < 0,01$). El análisis de la correlación estadística se realizó utilizando las pruebas Tau-b de Kendall y de Sperman. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Correlación entre la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de infliximab.

Parámetro	Prueba Tau-b de Kendall		Prueba de Sperman	
	Coeficiente de correlación	Valor p	Coeficiente de correlación	Valor p
Biodisponibilidad	-0,491	1,00E-06	-0,606	1,00E-06
Capacidad inmunógena				

25 Correlaciones clínicas: se analizaron las correlaciones entre la biodisponibilidad, la capacidad inmunógena y la actividad de la enfermedad en base a los valores de DAS28. Las respuestas clínicas se correlacionan fuertemente con los niveles de infliximab libre (biodisponibilidad del fármaco) y la formación de anticuerpos anti-infliximab (capacidad inmunógena del fármaco) (tabla 9). Además, la concentración de infliximab y los anticuerpos contra el fármaco se correlacionan fuertemente ($p < 0,001$). La concentración de infliximab se correlaciona inversamente con DAS28 ($p < 0,001$), mientras que la concentración de anticuerpos anti-infliximab se correlaciona directamente con DAS28 ($p < 0,001$).

Tabla 9. Correlación entre la biodisponibilidad de infliximab, anticuerpos anti-infliximab (capacidad inmunógena) y DAS28. Un valor p positivo indica una correlación directa. Un valor p negativo indica una correlación inversa, valores $p < 0,05$ o $< -0,05$ son estadísticamente significativos.

	Concentración de infliximab ($\mu\text{g/ml}$) (Biodisponibilidad)	Concentración de anticuerpos anti-infliximab (UA/ml) (Capacidad inmunógena)	DAS28
Concentración de infliximab ($\mu\text{g/ml}$)	-	$p < -0,001$	$p < -0,001$
Concentración de anticuerpos anti-infliximab (UA/ml)	$p < -0,001$	-	$p < 0,001$
DAS28	$p < -0,001$	$p < 0,001$	-

Determinación de los límites de diagnóstico: según el protocolo estándar para determinar la capacidad inmunógena, nunca hay un valor cuantitativo positivo de anticuerpos anti-infliximab por encima de $1,5 \mu\text{g/ml}$ de infliximab libre. Por lo tanto, el límite de diagnóstico se determinó midiendo la concentración de anticuerpos anti-infliximab con el protocolo de disociación con ácido en aquellas muestras con concentraciones de infliximab libre por debajo de $1,5 \mu\text{g/ml}$. Se analizaron 45 pacientes (183 muestras) que cumplían estos criterios. El 51% de los pacientes (el 33% de las muestras) mostraban un valor cuantitativo de capacidad inmunógena positivo (tabla 10).

Tabla 10. Detección de anticuerpos anti-infliximab utilizando el protocolo de disociación con ácido en muestras con infliximab libre por debajo de $1,5 \mu\text{g/ml}$

Nº de muestras	Nº de pacientes	Muestras positivas después del protocolo de disociación con ácido/pacientes
183	45	60 (33%)/23

Se estudió además si existe una relación entre el nivel de infliximab libre por debajo de $1,5 \mu\text{g/ml}$ y la presencia de anticuerpos anti-infliximab por encima de 15 UA/ml (equivalente a 150 ng/ml de anticuerpos) (límite de detección) con DAS28 (tabla 11) en toda la cohorte de pacientes.

Tabla 11. Actividad de la enfermedad en función de los límites de biodisponibilidad y capacidad inmunógena. SD, desviación estándar, valor $p < 0,05$ es estadísticamente significativo.

Agrupamiento	DAS28 promedio	SD	Valor p
Infliximab $> 1,5 \mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab $< 15 \text{ UA/ml}$	3,35	0,97	$< 0,01$
Infliximab $< 1,5 \mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab $> 15 \text{ UA/ml}$	3,89	1,41	

Los presentes inventores estudiaron la misma relación entre pacientes que responden y que no responden al tratamiento (tabla 12).

Tabla 12. Correlación de los límites de biodisponibilidad y capacidad inmunógena de infliximab con la respuesta clínica. SD, desviación estándar. Se consideran diferentes combinaciones de límites. Valores $p < 0,05$ son estadísticamente significativos.

Población	Combinación de límites	DAS28 promedio (N)	SD	valor p
Con respuesta clínica	Infliximab libre $>1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab <15 UA/ml	3,30 (107)	0,98	0,546
	Infliximab libre $<1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab >15 UA/ml	3,51 (41)	1,28	
Sin respuesta clínica	Infliximab libre $>1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab <15 UA/ml	3,52 (33)	0,97	$<0,01$
	Infliximab libre $<1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab >15 UA/ml	4,25	1,46	

Está demostrado que pacientes con una biodisponibilidad de infliximab menor de $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ y anticuerpos anti-infliximab mayores de 15 UA/ml muestran una DAS28 mayor que aquellos pacientes con biodisponibilidad de infliximab mayor de $1,5$ $\mu\text{g/ml}$.

Por lo tanto, si un paciente muestra una combinación de infliximab libre menor de ($<$) $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab mayores de ($>$) 15 UA/ml, existe una mayor probabilidad de que el individuo sea uno que no responde al tratamiento con infliximab, mostrando una elevada actividad de la enfermedad (véase las directrices de EULAR en la tabla 1).

La figura 3 muestra cómo las variables de biodisponibilidad de infliximab (concentración circulante de infliximab) y capacidad inmunógena de infliximab (anticuerpos anti-infliximab) están asociados al índice DAS28 y, por lo tanto, pueden usarse para clasificar pacientes y predecir el estado de un paciente según la directrices DAS de EULAR.

Por consiguiente, un paciente que muestra una combinación de infliximab libre igual a o mayor de ($\geq$) $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab iguales a o menores de ($\leq$) 15 UA/ml tiene una mayor probabilidad de ser un paciente que responde al tratamiento con infliximab; sin embargo, los pacientes que muestran una biodisponibilidad menor de $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ y anticuerpos anti-infliximab mayores de 15 UA/ml tienen una mayor probabilidad de ser pacientes que no responden al tratamiento con infliximab.

Algoritmo de decisión de infliximab: está demostrado que la respuesta clínica a infliximab sigue estrechamente los niveles de fármaco y la presencia de anticuerpos dirigidos contra el fármaco.

Está demostrado, por lo tanto, que si un paciente tiene un valor de biodisponibilidad por debajo de $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y un valor de capacidad inmunógena por encima de 15 UA/ml, esto se correlacionará con ninguna respuesta clínica al tratamiento, por lo tanto un valor de DAS28 incrementado (actividad de la enfermedad moderada o alta) en comparación con aquellos con valores de biodisponibilidad por encima de $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$).

Ninguno de los pacientes analizados mostraba anticuerpos anti-infliximab si la concentración de infliximab libre estaba por encima de $1,5$ $\mu\text{g/ml}$.

El siguiente algoritmo de decisión puede construirse a partir de los datos:

1. Análisis	Determinación de la biodisponibilidad de infliximab libre Y análisis de anticuerpos anti-infliximab	
2. Resultado	Concentración de infliximab libre $>1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab <15 UA/ml	Concentración de infliximab libre $<1,5$ $\mu\text{g/ml}$ Y anticuerpos anti-infliximab >15 UA/ml
3. Clasificación del paciente	Que responde al tratamiento	Que no responde al tratamiento
4. Acción	Ninguna. Tratamiento adecuado	Tratamiento insuficiente. Se requiere seguimiento. El tratamiento debe considerarse.

EJEMPLO 2

Correlación de la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de adalimumab con la respuesta clínica de pacientes que padecen artritis reumatoide

5 Sujetos: pacientes con artritis reumatoide, 49, que cumplen los criterios ACR de 1987 y a punto de empezar el tratamiento con adalimumab, se inscribieron de forma consecutiva. Se analizaron 171 muestras de suero.

10 Tratamiento: los pacientes recibieron dosis de 40 mg de adalimumab (Humira®), por vía subcutánea, cada dos semanas.

Evaluación de la respuesta clínica del paciente: se utilizó DAS28 para evaluar la respuesta clínica del paciente según las puntuaciones en la tabla 1 (ejemplo 1).

15 Correlación de biodisponibilidad y capacidad inmunógena: la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de adalimumab se correlacionan fuertemente ($p < 0,05$). El análisis de correlación estadística se realizó utilizando los prueba Tau-b de Kendall y Sperman. Los resultados de correlación se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Correlación entre la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena de adalimumab.				
Parámetro	Prueba Tau-b de Kendall		Prueba de Sperman	
	Coeficiente de correlación	Valor p	Coeficiente de correlación	Valor p
Biodisponibilidad	-0,363	1,00E-06	-0,444	1,00E-06
Capacidad inmunógena				

20 Correlaciones clínicas: se analizó la correlación entre la biodisponibilidad, la capacidad inmunógena y la actividad de la enfermedad en base a los valores de DAS28. La respuesta clínica se correlaciona fuertemente con el nivel de adalimumab libre (biodisponibilidad del fármaco) y anticuerpos contra adalimumab (capacidad inmunógena) (tabla 14).

Tabla 14. Correlación entre la biodisponibilidad de adalimumab, anticuerpos anti-adalimumab (capacidad inmunógena) y DAS28. Un valor p positivo indica una correlación directa. Un valor p negativo indica una correlación inversa, valores $p < 0,05$ o $< -0,05$ son estadísticamente significativos.			
	Concentración de adalimumab ($\mu\text{g/ml}$) (Biodisponibilidad)	Concentración de anticuerpos anti-adalimumab (UA/ml) (Capacidad inmunógena)	DAS28
Concentración de adalimumab ($\mu\text{g/ml}$)	-	-0,001 (171)	-0,001 (102)
Concentración de anticuerpos anti-adalimumab (UA/ml)	-0,001 (171)	-	0,09 (102)
DAS28	-0,001 (102)	0,09 (102)	-
*valor p de 0,06 se considera estadísticamente significativo. El valor está muy cerca de los criterios de significación de $p < 0,05$, y por lo tanto clínicamente relevante.			

25 Determinación de límites de diagnóstico: según el protocolo estándar para determinar la capacidad inmunógena, no existe nunca un valor cuantitativo positivo de anticuerpos anti-adalimumab por encima de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de adalimumab libre. Por lo tanto, el límite de diagnóstico se determinó midiendo la concentración de anticuerpos anti-adalimumab con el protocolo de disociación con ácido en aquellas muestras con concentraciones de adalimumab libre por debajo de 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Se analizaron 54 muestras que cumplían estos criterios. El 22% de los pacientes con adalimumab libre por debajo de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ mostraban un valor cuantitativo de capacidad inmunógena positivo, y el 77% de los pacientes con adalimumab libre por debajo del límite de detección (2 ng/ml) mostraban un valor cuantitativo de capacidad inmunógena positivo (tabla 15).

Tabla 15. Detección de anticuerpos anti-adalimumab que utilizan el protocolo de disociación con ácido en muestras con adalimumab libre por debajo de 0,8 µg/ml y sin anticuerpos contra adalimumab.

Adalimumab libre < 2 ng/ml, sin anticuerpos			Adalimumab libre < 0,8 µg/ml, sin anticuerpos	
	Nº de muestras	Nº de pacientes	Nº de muestras	Nº de pacientes
	28	18	26	13
Positivo después de disociación con ácido	5 (18%)	4 (22%)	10 (38%)	10 (77%)

Se estudió si existe una relación entre el nivel de adalimumab libre por debajo de 0,8 µg/ml y la presencia de anticuerpos anti-adalimumab por encima de 8 UA/ml (equivalente a 32 ng/ml de anticuerpos) (límite de detección) con DAS28 (tabla 16) en toda la cohorte de pacientes.

5

Tabla 16. Actividad de la enfermedad en función de los límites de la biodisponibilidad y la capacidad inmunógena. El valor $p < 0,05$ es estadísticamente significativo.

Agrupamiento	DSA28 promedio		Valor p
Adalimumab > 0,8 µg/ml Y anticuerpos anti-adalimumab < 8 UA/ml	2,56 (53)		0,037
Adalimumab < 0,8 µg/ml Y anticuerpos anti-adalimumab > 8 UA/ml	3,27 (4)		

Se ha demostrado que pacientes con una biodisponibilidad de adalimumab menor de 0,8 µg/ml y anticuerpos anti-adalimumab mayores de 8 UA/ml (equivalente a 32 ng/ml de anticuerpos) muestran un valor de DAS28 mayor en comparación con aquellos con una biodisponibilidad de adalimumab mayor de 0,8 µg/ml y anticuerpos anti-adalimumab menores de 8 UA/ml. Esta diferencia de DAS28 es estadísticamente significativa.

10

Por lo tanto, si un paciente muestra una combinación de adalimumab libre menor de (<) 0,8 µg/ml Y anticuerpos anti-adalimumab mayores de (>) 8 UA/ml, existe una mayor probabilidad de que el individuo sea uno que no responde al tratamiento con adalimumab, mostrando una alta actividad de la enfermedad (véase las directrices de EULAR en la tabla 1 y la tabla 16).

15

Por consiguiente, un paciente que muestra una combinación de adalimumab libre igual a o mayor de ($\geq$) 0,8 µg/ml Y anticuerpos anti-adalimumab iguales a o menores de ($\leq$) 8 UA/ml tiene una mayor probabilidad de ser un paciente que responde al tratamiento con adalimumab.

20

Algoritmo de decisión de adalimumab: se ha demostrado que la respuesta clínica a adalimumab sigue estrechamente los niveles de fármaco y la presencia de anticuerpos dirigidos contra el fármaco.

Está demostrado que si un paciente tiene un valor de biodisponibilidad por debajo de 0,8 µg/ml Y un valor de capacidad inmunógena por encima de 8 UA/ml (equivalente a 32 ng/ml de anticuerpos), esto correlacionará con una mayor probabilidad de no mostrar ninguna respuesta clínica al tratamiento, por lo tanto un valor incrementado de DAS28 (actividad de la enfermedad moderada o alta) en comparación con aquellos con valores de biodisponibilidad por encima de 0,8 µg/ml ($p < 0,001$).

25

Ninguno de los pacientes analizados mostraba anticuerpos anti-adalimumab si la concentración de adalimumab libre estaba por encima de 0,8 µg/ml.

30

El siguiente algoritmo de decisión puede construirse a partir de los datos:

1. Análisis	Determinación de la biodisponibilidad de adalimumab libre Y análisis de anticuerpos anti-adalimumab	
2. Resultado	Concentración de adalimumab libre $\geq 0,8$ µg/ml Y anticuerpos anti-adalimumab < 8 UA/ml	Concentración de adalimumab libre < 0,8 µg/ml Y anticuerpos anti-adalimumab > 8 UA/ml
3. Clasificación del paciente	Que responde al tratamiento	Que no responde al tratamiento
4. Acción	Ninguna. Tratamiento adecuado	Tratamiento insuficiente. Se requiere seguimiento. El tratamiento debe considerarse.

35

EJEMPLO 3

Correlación de la biodisponibilidad de infliximab con la respuesta clínica de pacientes que padecen artritis reumatoide

Se realizaron experimentos tal como se ha descrito en el ejemplo 1 excepto que los niveles de anticuerpos anti-infliximab no se analizaron. Por lo tanto, los pacientes se clasificaron según el límite terapéutico de infliximab.

Las concentraciones mínimas de infliximab son significativamente mayores (2,73 µg/ml) en pacientes que padecen artritis reumatoide que muestran una respuesta clínica buena o moderada (que responden) al tratamiento ($p=1E-09$) en comparación con los que no responden (0,002 µg/ml) después de un año de tratamiento (tabla 17).

Tabla 17. Comparación entre concentraciones mínimas de infliximab según los criterios de respuesta

Clasificación del paciente	Mediana de la concentración mínima de infliximab (µg/ml)	N	p
Que responde al tratamiento	2,73	71	1E-09
Que no responde al tratamiento	0,002	54	

Para calcular la frecuencia de pacientes con artritis reumatoide que responden y que no responden al tratamiento después de un año de tratamiento, realizamos pruebas de significación mediante análisis de Chi cuadrado (tabla 18). El número de pacientes que están clasificados como que responden al tratamiento es significativamente mayor que los que no responden al tratamiento cuando la concentración mínima de infliximab es $\geq 1,5$ µg/ml ($p=3,55E-07$). Por otro lado, el número de pacientes que están clasificados como que responden al tratamiento es significativamente menor que los que no responden al tratamiento cuando la concentración mínima de infliximab es $< 1,5$ µg/ml ($p=0,028$).

Tabla 18. Comparación de la frecuencia de pacientes con artritis reumatoide que responden y que no responden al tratamiento dependiendo del límite de infliximab

Concentración de infliximab	Clasificación del paciente	N	$p(\chi^2)$
$\geq 1,5$ µg/ml	Que responde al tratamiento	43	3,5E-07
	Que no responde al tratamiento	7	
$< 1,5$ µg/ml	Que responde al tratamiento	28	0,028
	Que no responde al tratamiento	47	

Cuando la concentración mínima de infliximab es $\geq 1,5$ µg/ml, la concentración mediana de fármaco de pacientes que responden al tratamiento es de 3,64 µg/ml, mientras que es de 2,68 µg/ml en la población que no responde al tratamiento ($p=0,142$). Sin embargo, cuando la concentración mínima de infliximab es $< 1,5$ µg/ml, la concentración mediana de pacientes que responden al tratamiento es significativamente mayor (0,06 µg/ml) que en la población que no responde al tratamiento (0,002 µg/ml) ($p=4,23E-03$) (tabla 19).

Tabla 19. Concentración mediana de infliximab para poblaciones que responden y que no responden al tratamiento dependiendo del límite de infliximab

Concentración de infliximab	Clasificación del paciente	N	Mediana	$p(\text{Kruskal-Wallis})$
$\geq 1,5$ µg/ml	Que responde al tratamiento	43	3,6472	0,142
	Que no responde al tratamiento	7	2,688	
$< 1,5$ µg/ml	Que responde al tratamiento	28	0,0607	4,2E-03
	Que no responde al tratamiento	47	0,002	

Por lo tanto, si un paciente tiene una concentración mínima de infliximab $< 1,5$ µg/ml es más probable que haya perdido eficacia del fármaco y esté clasificado como que no responde al tratamiento, necesitando por lo tanto una revisión del régimen de tratamiento. Por otro lado, si un paciente tiene una concentración mínima de infliximab $\geq 1,5$

µg/ml es más probable que el paciente corresponda a uno que responde al tratamiento, dado que el paciente está expuesto a niveles eficaces del fármaco.

EJEMPLO 4

Correlación de la biodisponibilidad de adalimumab con la respuesta clínica de pacientes que padecen artritis reumatoide

Se realizaron experimentos, tal como se describe en el ejemplo 2, excepto que los niveles de anticuerpo anti-adalimumab no se analizaron. Por lo tanto, los pacientes se clasificaron según el límite terapéutico de adalimumab.

Las concentraciones mínimas de adalimumab son significativamente mayores (12,25 µg/ml) en pacientes que padecen artritis reumatoide que muestran una respuesta clínica buenas o moderada (que responden) al tratamiento ($p=0,0005$) en comparación con los que no responden (4,15 µg/ml) después de dos años de tratamiento (tabla 20).

Tabla 20. Comparación entre concentraciones mínimas de adalimumab según los criterios de respuesta

Clasificación del paciente	Mediana de la concentración mínima de adalimumab (µg/ml)	N	p
Que responde al tratamiento	12,25	16	0,0005
Que no responde al tratamiento	4,15	45	

Para calcular la frecuencia de pacientes con artritis reumatoide que responden y que no responden al tratamiento después de dos años de tratamiento, se realizaron pruebas de significación mediante análisis de Chi-cuadrado (tabla 21). Todos los pacientes con una concentración mínima de adalimumab $<0,8$ µg/ml son que no responden al tratamiento. Ningún paciente se clasificó como que responde al tratamiento con concentraciones mínimas de adalimumab $<0,8$ µg/ml.

Tabla 21. Comparación de la frecuencia de pacientes con artritis reumatoide que responden y que no responden al tratamiento dependiendo del límite de adalimumab

Concentración de adalimumab	Clasificación del paciente	N	$p(\chi^2)$
$\geq 0,8$ µg/ml	Que responde al tratamiento	16	0,093
	Que no responde al tratamiento	27	
$<0,8$ µg/ml	Que responde al tratamiento	0	$p<0,05$
	Que no responde al tratamiento	16	

Cuando la concentración mínima de adalimumab es $\geq 0,8$ µg/ml, la concentración mediana de fármaco de pacientes con artritis reumatoide que responden al tratamiento es de 12,25 µg/ml, mientras que es de 6,73 µg/ml en la población que no responde al tratamiento (tabla 22).

Tabla 22. Concentración mediana de adalimumab para poblaciones que responden y que no responden al tratamiento dependiendo del límite de adalimumab

Concentración de adalimumab	Clasificación del paciente	N	Mediana	$p(\text{Kruskal-Wallis})$
$\geq 0,8$ µg/ml	Que responde al tratamiento	16	12,25	0,06
	Que no responde al tratamiento	27	6,73	
$<0,8$ µg/ml	Que responde al tratamiento	0	0	$p<0,5$
	Que no responde al tratamiento	16	0,00008	

En conclusión, si un paciente tiene una concentración mínima de adalimumab $<0,8$ µg/ml es más probable que haya perdido eficacia del fármaco y se clasifique como que no responde al tratamiento, necesitando por lo tanto una revisión del régimen de tratamiento. Por otro lado, si un paciente tiene una concentración mínima de adalimumab

≥0,8 µg/ml existe una probabilidad incrementada de que el paciente pudiera estar respondiendo a la terapia.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Proteomika. S.L.

<120> PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON FÁRMACOS BIOLÓGICOS

<130> P5689PC00

10 <150> EP10382346
<151> 22-12-2010

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 233

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

ES 2 526 597 T3

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

<210> 2

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met His His His His His His Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser
1 5 10 15

Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val
35 40 45

Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu
50 55 60

Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His
65 70 75 80

Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr
85 90 95

Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr
100 105 110

Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly
115 120 125

Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn
130 135 140

Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly
145 150 155 160

Ile Leu Ala Leu

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para clasificar un paciente que padece artritis reumatoide como un paciente que responde o que no responde a un tratamiento, comprendiendo dicho tratamiento la administración a dicho paciente de un fármaco biológico seleccionado entre el grupo que comprende infliximab y adalimumab que es administrado periódicamente mediante administraciones repetitivas, y en el que dicho paciente ha recibido, como mínimo, una dosis de dicho fármaco biológico, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) determinar la concentración del fármaco biológico circulante en una muestra de dicho paciente en un tiempo t1 en el que dicho t1 corresponde a un punto temporal dentro del periodo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de dicho fármaco biológico;
 - b) determinar la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico en una muestra de dicho paciente en un tiempo t1; y
 - c) comparar la concentración del fármaco biológico circulante en dicho t1 con un valor de referencia 1 (VR1) y la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico en dicho tiempo t1 con un valor de referencia 2 (VR2), en el que la muestra se selecciona entre una muestra de sangre, una muestra de plasma y una muestra de suero; VR1 es un valor límite de eficacia terapéutica de la concentración del fármaco biológico circulante; y VR2 es el valor límite de la concentración de dicho anticuerpo contra el fármaco biológico, según lo determinado en un grupo de individuos que nunca han recibido tratamiento mediante el mismo ensayo que el utilizado para determinar la concentración del anticuerpo contra el fármaco biológico en la etapa b), y en el que si la concentración del fármaco biológico circulante es menor que VR1 y la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico es mayor que VR2, entonces dicho paciente se clasifica como un paciente que no responde a dicho tratamiento, y en el que si la concentración del fármaco biológico circulante es igual a, o mayor que VR1 y la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico es igual a, o menor que, VR2, entonces dicho paciente se clasifica como un paciente que responde a dicho tratamiento, y en el que si el fármaco biológico es infliximab, entonces VR1 es 1,5 µg/ml y VR2 es 150 ng/ml; y en el que si el fármaco biológico es adalimumab, entonces VR1 es 0,8 µg/ml y VR2 es 32 ng/ml.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho t1 es un punto temporal dentro de las dos últimas semanas antes de la administración del fármaco biológico, preferentemente dentro de la última semana antes de la administración del fármaco biológico.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la concentración del fármaco biológico circulante se determina mediante un inmunoensayo.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de anticuerpos contra dicho fármaco biológico se determina mediante un inmunoensayo.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que el inmunoensayo es un ELISA.

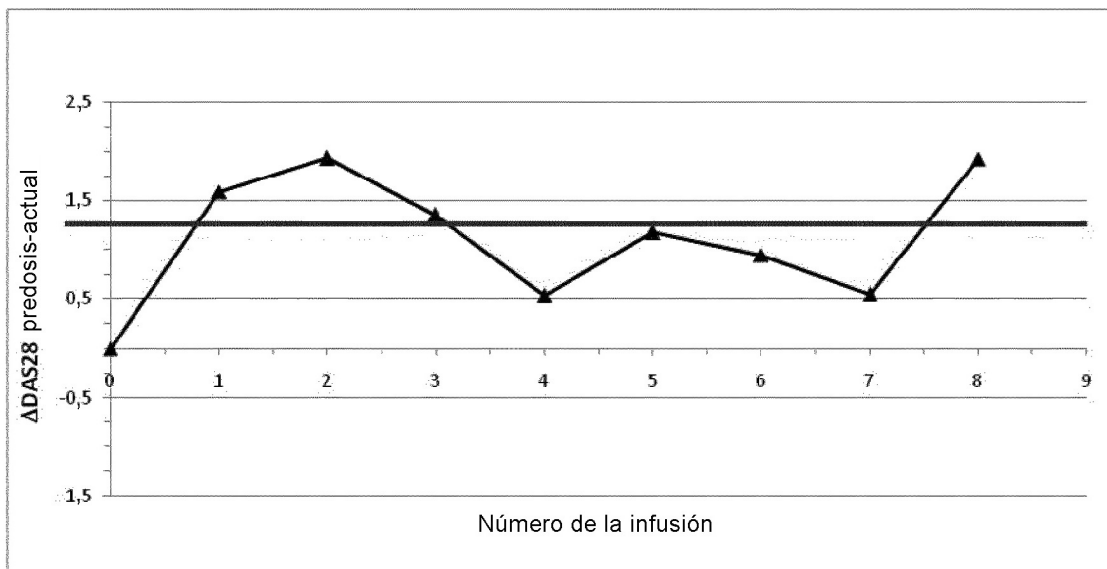
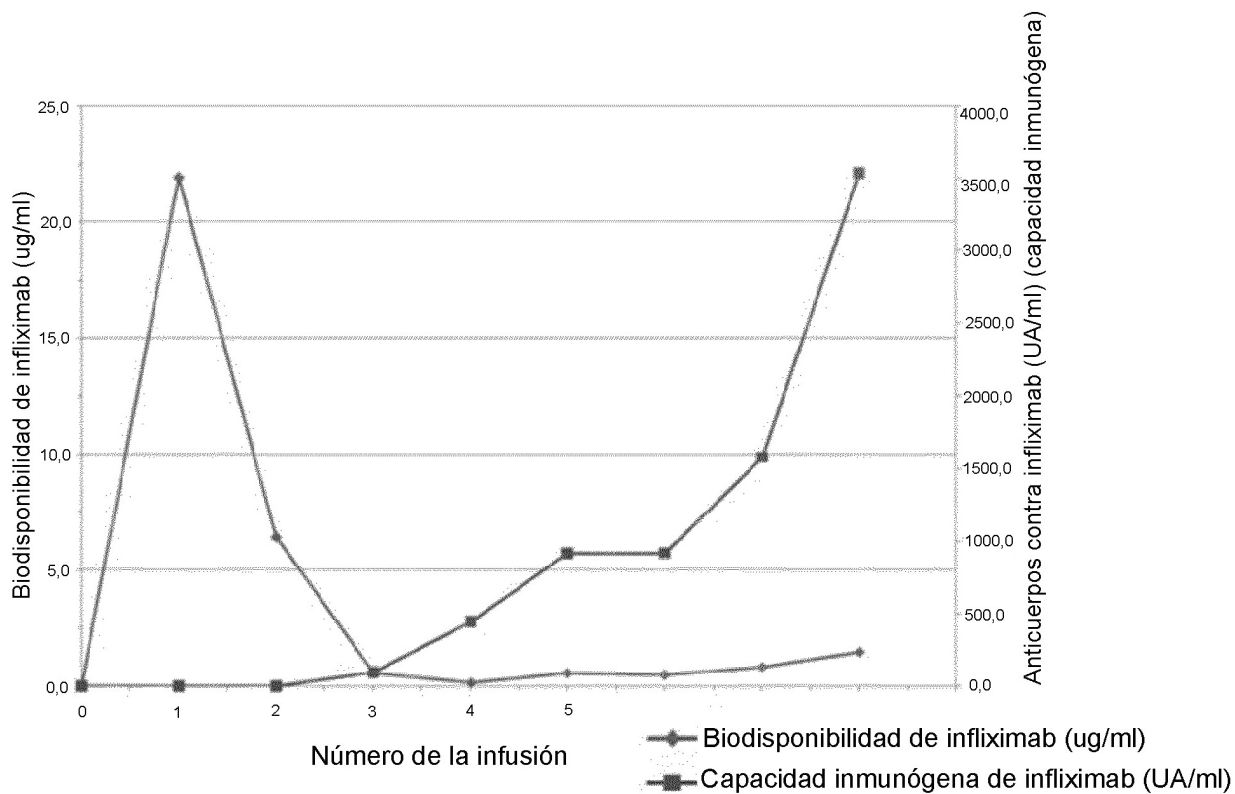


FIG. 1

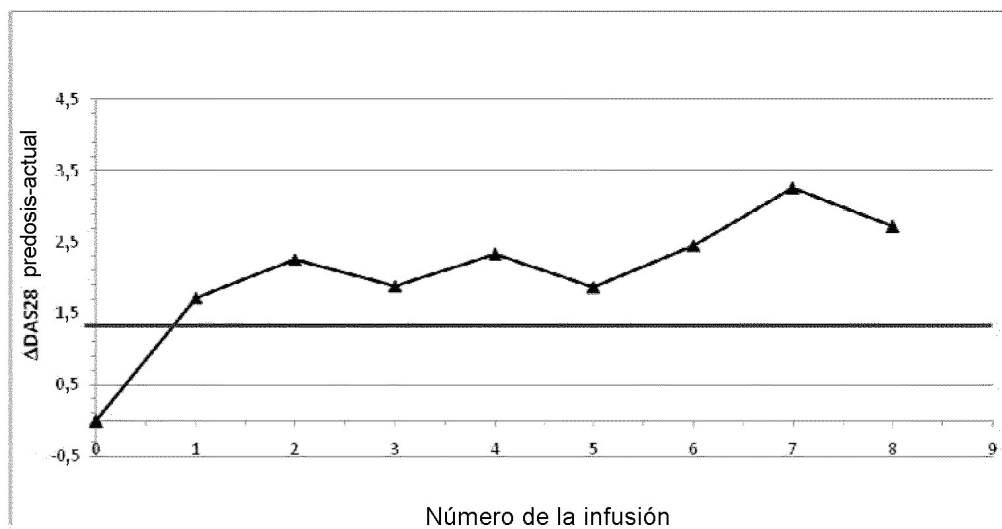
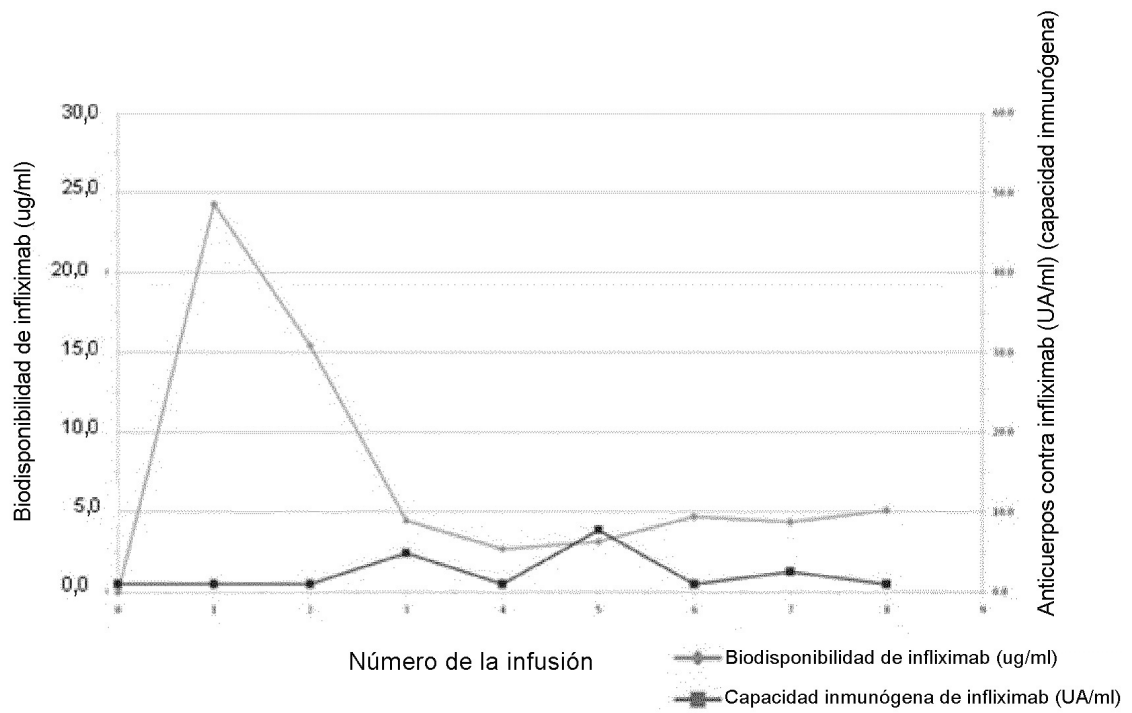


FIG. 2

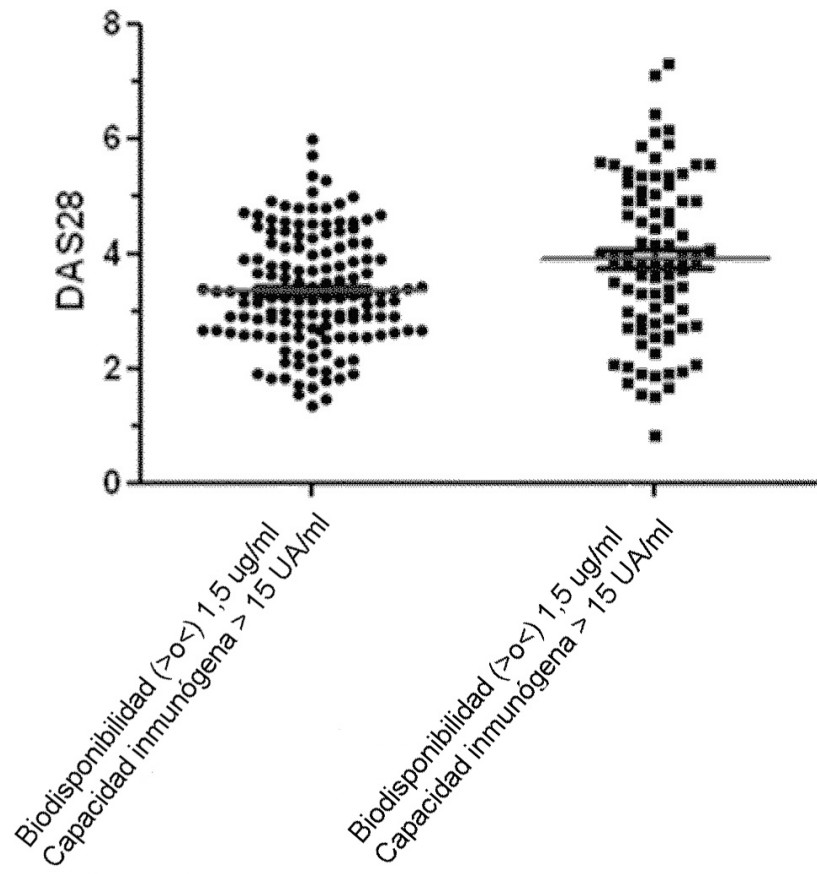


FIG. 3