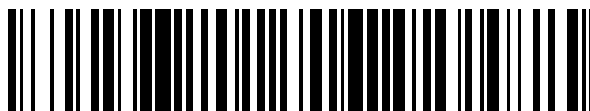


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 175**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2012 E 12707193 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2676137**

54 Título: **Ensayos para la detección de autoanticuerpos contra fármacos anti-TNF**

30 Prioridad:

17.02.2011 US 201161444097 P

10.05.2011 US 201161484594 P

13.06.2011 US 201161496501 P

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

26.02.2015

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)

Avenue Nestlé 55

1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

SINGH, SHARAT;

WANG, SHUI LONG;

OHRMUND, LINDA y

HAUENSTEIN, SCOTT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 175 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

Ensayos para la detección de autoanticuerpos contra fármacos anti-TNF

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los trastornos autoinmunitarios son un problema médico significativo y muy extendido. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria afecta a más de dos millones de personas en los Estados Unidos. La AR provoca una inflamación crónica de las articulaciones y típicamente es una enfermedad progresiva que presenta el potencial de causar la destrucción articular y discapacidad funcional. La causa de la artritis reumatoide es desconocida, aunque se han implicado en la etiología de la enfermedad la predisposición genética, agentes infecciosos y factores medioambientales. En la AR activa, entre los síntomas pueden incluirse la fatiga, la falta de apetito, la fiebre moderada, dolores musculares y articulares y la rigidez. Además, durante los brotes de la enfermedad, las articulaciones con frecuencia se enrojecen, se hinchan, y están dolorosas y sensibles, debido a la inflamación del sinovio. Además, debido a que la AR es una enfermedad sistémica, la inflamación puede afectar a órganos y áreas del cuerpo diferentes de las articulaciones, incluyendo glándulas de los ojos y la boca, el revestimiento pulmonar, el pericardio y los vasos sanguíneos.

Aarden *et al.* describen la inmunogenicidad de los anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral y proporcionan métodos de medición de anti-anticuerpos (Current Opinion in Immunology, Elsevier, Oxford, GB, vol. 20, nº 4, 1 de agosto de 2008, páginas 431 a 435).

El documento nº US 2009/035216 da a conocer un método para determinar la concentración y biodisponibilidad *in vivo* de biofarmacéuticos.

Sickert *et al.* comentan la mejora de la tolerancia farmacológica en los ensayos de inmunogenicidad mediante el tratamiento con ácido en Biacore (Journal of Immunological Methods, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, NL, vol. 334, nº 1-2, 20 de mayo de 2008, páginas 29 a 36).

Lofgren *et al.* describen la detección de anticuerpos neutralizadores anti-proteína terapéutica en muestras de suero o plasma que contienen niveles elevados de la proteína terapéutica (Journal of Immunological Methods, Elsevier, Science Publishers B.V., Amsterdam, NL, vol. 308, nº 1-2, 20 de enero de 2006, páginas 101 a 108).

Bourdage *et al.* dan a conocer un ensayo de captura por afinidad y elución (CAE) para la detección de anticuerpos antifármaco contra terapéuticos de anticuerpo monoclonal en presencia de niveles elevados de fármaco (Journal of Immunological Methods, Elsevier, Science Publishers B.V., Amsterdam, NL, vol. 327, nº 1-2, 25 de septiembre de 2007, páginas 10 a 17).

Smith *et al.* describen la detección de anticuerpos contra proteínas terapéuticas en presencia de proteína terapéutica residual utilizando una extracción en fase sólida con tratamiento de las muestras mediante disociación ácida (SPEAD) previamente al ELISA (Regulatory Toxicology and Pharmacology, Academic Press, New York, NY, US, vol. 49, nº 3, 13 de noviembre de 2007, páginas 230 a 237).

Patton *et al.* informan de un ELISA de puente con disociación ácida para la detección de anticuerpos dirigidos contra proteína terapéuticas en presencia del antígeno, Journal of Immunological Methods, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, NL, vol. 304, nº 1-2, 1 de septiembre de 2005, páginas 189 a 195).

Canan Abay *et al.* informan de la demostración de anticuerpos específicos contra infliximab inducidos durante el tratamiento de un paciente con espondilitis anquilosante (Rheumatology International; Clinical and Experimental Investigations, Springer, Berlin, DE, vol. 26, nº 5, 1 de marzo de 2006, páginas 473 a 480).

Bendtzen *et al.* describen el seguimiento individualizado de la biodisponibilidad e inmunogenicidad farmacológicas en pacientes de artritis reumatoide tratados con el inhibidor del factor alfa de necrosis tumoral infliximab (Arthritis & Rheumatism, John Wiley & Sons, Inc., US, vol. 54, nº 12, 1 de diciembre de 2006, páginas 3782 a 3789).

Rojas J.R. *et al.* informan de la formación, distribución y eliminación de complejos inmunitarios de infliximab y anti-infliximab en monos *Cynomolgus* (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, US, vol. 313, nº 2, 1 de mayo de 2005, páginas 578 a 585).

Entre los tratamientos tradicionales para el control de la AR y otros trastornos autoinmunitarios se incluyen "fármacos de primera línea" de acción rápida y "fármacos de segunda línea", de acción más lenta. Los fármacos de primera línea reducen el dolor y la inflamación. Entre los ejemplos de dichos fármacos de primera línea se incluyen la aspirina, el naproxeno, el ibuprofeno, el etodolac y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), así

como corticoesteroides, administrados por vía oral o inyectados directamente en los tejidos y articulaciones. Los fármacos de segunda línea inducen la remisión de la enfermedad y previenen la progresiva destrucción articular y también se denominan fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o FAME. Entre los ejemplos de fármacos de segunda línea se incluyen el oro, la hidrocloroquina, la azulfidina y los agentes inmunosupresores, tal como el metotrexato, la azatioprina, la ciclofosfamida, el clorambucilo y la ciclosporina. Sin embargo, muchos de estos fármacos presentan efectos secundarios perjudiciales. De esta manera, se han buscado terapias adicionales para la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios.

El factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) es una citoquina producida por numerosos tipos celulares, incluyendo los monocitos y macrófagos, que originalmente se identificó basándose en su capacidad de inducir la necrosis de determinados tumores de ratón. Posteriormente, se demostró que un factor denominado caquectina, asociado a la caquexia, era idéntico al TNF- α . Se ha implicado el TNF- α en la fisiopatología de una diversidad de otras enfermedades y trastornos humanos, incluyendo el choque, la sepsis, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, AR, enfermedad de Crohn, rechazo del trasplante y la enfermedad del injerto contra el huésped.

Debido al papel perjudicial del TNF- α humano (hTNF- α) en una diversidad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad del TNF- α humano. En particular, se han buscado anticuerpos que se unen a hTNF- α y lo neutralizan como medio para inhibir la actividad de hTNF- α . Algunos de los primeros de dichos anticuerpos eran anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón, secretados por hibridomas preparados a partir de linfocitos de ratones inmunizados con hTNF- α (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.231.024, de Moeller *et al.*). Aunque dichos anticuerpos anti-hTNF- α de ratón con frecuencia muestran una elevada afinidad para hTNF- α y son capaces de neutralizar la actividad de hTNF- α , su utilización *in vivo* se ha limitado a los problemas asociados a la administración de anticuerpos de ratón en seres humanos, tales como una semivida en suero corta, una incapacidad de inducir determinadas funciones efectoras humanas y la inducción de una respuesta inmunológica no deseada contra anticuerpos de ratón en un ser humano (la reacción "anticuerpo humano antiratón" (HAMA)).

Más recientemente, se han aplicado terapias biológicas al tratamiento de trastornos autoinmunitarios tales como la artritis reumatoide. Por ejemplo, la FDA ha aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide cuatro inhibidores de TNF- α : REMICADE™ (infliximab), un mAb quimérico anti-TNF- α , ENBREL™ (etanercept), una proteína de fusión TNFR-Fc de Ig, HUMIRA™ (adalimumab), un mAb humano anti-TNF- α y CIMZIA® (certolizumab pegol), un fragmento Fab PEGilado. También se utiliza CIMZIA® para el tratamiento de enfermedad de Crohn (EC) moderada a grave. Aunque dichas terapias biológicas han demostrado tener éxito en el tratamiento de la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios tales como la EC, no todos los sujetos tratados responden, o responden bien, a dicha terapia. Además, la administración de inhibidores de TNF- α puede inducir una respuesta inmunológica al fármaco y conducir a la producción de autoanticuerpos, tales como anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA), anticuerpos humanos antihumanizados (HAHA) y anticuerpos humanos antiratón (HAMA). Dichas respuestas inmunológicas HACA, HAHA o HAMA pueden asociarse a reacciones de hipersensibilidad y cambios drásticos en la farmacocinética y distribución biológica del inhibidor inmunoterapéutico de TNF- α que impiden el tratamiento posterior con el fármaco. De esta manera, existe una necesidad en la técnica de ensayos para detectar la presencia de autoanticuerpos contra elementos biológicos anti-TNF- α en una muestra de un paciente para el seguimiento de la terapia con inhibidores de TNF- α y para guiar las decisiones de tratamiento. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ensayos para detectar y medir la presencia o nivel de autoanticuerpos contra terapéuticos farmacológicos anti-TNF- α en una muestra. La presente invención resulta útil para optimizar la terapia y realizar un seguimiento de los pacientes que reciben terapéuticos farmacológicos anti-TNF- α para la detección de la presencia o el nivel de autoanticuerpos (por ejemplo HACA y/o HAHA) contra el fármaco. La presente invención proporciona además métodos para seleccionar la terapia, optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en sujetos que reciben fármacos anti-TNF- α para el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por TNF- α .

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia o el nivel de un autoanticuerpo contra un fármaco anti-TNF- α en una muestra sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra con un ácido para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α , en el que la muestra presenta o se sospecha que presenta un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α ,

(b) poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado tras la disociación de los complejos preformados, en el que opcionalmente la etapa (b) comprende además poner en contacto un control interno marcado con la muestra,

- (c) neutralizar el ácido en la muestra para formar complejos marcados del fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo,
- (d) someter los complejos marcados a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los complejos marcados, y
- (e) detectar los complejos marcados, detectando de esta manera la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra.

La muestra puede ponerse en contacto con un ácido a una concentración de entre 0,1 M y 5 M.

El ácido puede neutralizarse mediante la adición de uno o más agentes neutralizadores a la muestra.

La muestra puede obtenerse de un sujeto que recibe terapia con el fármaco anti-TNF- α .

Los complejos pueden eluirse en primer lugar, seguido de fármaco anti-TNF- α marcado libre.

El fármaco anti-TNF- α puede marcarse con un fluoróforo o un pigmento fluorescente.

Los métodos para detectar fármacos anti-TNF- α y anticuerpos antifármacos se describen adicionalmente en la publicación de patente PCT n° WO 2011/056590.

En otros aspectos, la presente invención proporciona un método para seleccionar un curso de terapia (por ejemplo para seleccionar un fármaco anti-TNF- α apropiado) para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por TNF- α en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) detectar la presencia o el nivel de un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α en una muestra del sujeto sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, comprendiendo el método:

(i) poner en contacto la muestra con un ácido para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α , en el que la muestra presenta o se sospecha que presenta un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α ,

(ii) poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado tras la disociación de los complejos preformados,

(iii) neutralizar el ácido en la muestra para formar complejos marcados del fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo,

(iv) someter los complejos marcados a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los complejos marcados, y

(v) detectar los complejos marcados, detectando de esta manera la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, y

(b) determinar una dosis posterior del curso de terapia para el sujeto o si debería administrarse un curso de terapia diferente en el sujeto basándose en la presencia o el nivel del autoanticuerpo, optimizando de esta manera la terapia y/o reduciendo la toxicidad del fármaco anti-TNF- α .

La dosis posterior del curso de terapia puede incrementarse, reducirse o mantenerse basándose en la presencia o el nivel del autoanticuerpo.

El diferente curso de terapia puede comprender un fármaco anti-TNF- α diferente, o en el que el diferente curso de terapia comprende el curso de terapia actual conjuntamente con un agente inmunosupresor, o en el que el diferente curso de terapia comprende cambiar a un curso de terapia que no sea de un fármaco anti-TNF- α .

El fármaco anti-TNF- α puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, CNTO 148 y combinaciones de los mismos.

El autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de un anticuerpo humano antiquimérico (HACA), un anticuerpo humano antihumanizado (HAHA), un anticuerpo humano antiratón (HAMA) y combinaciones de los mismos.

El ácido puede comprender un ácido orgánico, un ácido inorgánico, o mezclas de los mismos, en el que opcionalmente el ácido orgánico comprende ácido cítrico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra ensayos ejemplares en los que se utilizó HPLC de exclusión por tamaño para detectar la unión entre TNF α -Alexa₆₄₇ y HUMIRATM.

La figura 2 muestra las curvas de dosis-respuesta de la unión de HUMIRATM a TNF α -Alexa₆₄₇.

- La figura 3 muestra un método actual basado en ELISA para medir los niveles de HACA, conocido como ensayo de puente.
- La figura 4 ilustra una descripción general ejemplar de los ensayos de detección de autoanticuerpos para medir las concentraciones de HACA/HAHA generados contra REMICADE™.
- 5 La figura 5 muestra un análisis de dosis-respuesta de unión de anticuerpo anti-IgG humano a REMICADE™-Alexa₆₄₇.
- La figura 6 muestra un segundo análisis de dosis-respuesta de unión de anticuerpo anti-IgG humano a REMICADE™-Alexa₆₄₇.
- 10 La figura 7 muestra curvas de dosis-respuesta de unión de anticuerpo anti-IgG humano a REMICADE™-Alexa₆₄₇.
- La figura 8 muestra la formación de inmunocomplejo REMICADE™-Alexa₆₄₇ en suero humano normal y suero positivo para HACA.
- La figura 9 proporciona un resumen de las mediciones de HACA de 20 muestras de suero de pacientes que se llevaron a cabo utilizando el ensayo de puente o el ensayo de cambio de movilidad.
- 15 La figura 10 proporciona un resumen y una comparación de los métodos actuales para la medición de concentraciones séricas de HACA con el nuevo ensayo HACA.
- La figura 11 muestra los perfiles de HPLC-CET de IFX marcado con fluoróforo (FI) incubado con suero normal (NHS) o positivo para HACA (PPH). La adición de cantidades crecientes de suero positivo para HACA a la mezcla de incubación desplazó de manera dependiente de la dosis el pico de IFX-FI a las posiciones de elución de masa molecular más alta, C1 y C2.
- 20 La figura 12 muestra las curvas de dosis-respuesta de IFX-FI unido y libre generadas con diluciones crecientes de suero positivo para HACA determinadas mediante el ensayo de cambio de movilidad. (A) Se incubaron diluciones crecientes de suero positivo para HACA con 37,5 ng de IFX-FI. A mayor dilución (menos HACA), se observó más IFX-FI libre en el análisis de HPLC-CET. (B) Se incubaron diluciones crecientes de suero positivo para HACA con 37,5 ng de IFX-FI. A mayor dilución (menos HACA), se observó menos IFX-FI unido a HACA en el análisis de HPLC-CET.
- 25 La figura 13 muestra los perfiles de HPLC-CET de TNF- α -FI incubado con suero normal (NHS) o suero con adición de IFX. La adición de cantidades crecientes de suero con adición de IFX a la mezcla de incubación desplazó de manera dependiente de la dosis el pico fluorescente de TNF- α a las posiciones de elución de masa molecular más alta.
- 30 La figura 14 muestra las curvas de dosis-respuesta de TNF- α unido y libre generadas con diluciones crecientes de suero con adición de IFX determinadas mediante el ensayo de cambio de movilidad. Las concentraciones crecientes de IFX añadido a la mezcla de incubación redujeron el porcentaje de TNF- α libre, incrementando simultáneamente el porcentaje de TNF- α unido.
- 35 La figura 15 muestra la medición del nivel relativo de HACA y la concentración de IFX en pacientes de EII tratados con IFX en diferentes puntos temporales, mediante el ensayo de cambio de movilidad.
- La figura 16 muestra la medición de control del paciente del nivel de HACA y de la concentración de IFX en sueros de pacientes de EII tratados con IFX en diferentes puntos temporales.
- La figura 17 muestra ensayos ejemplares para detectar la presencia de (A) autoanticuerpos no neutralizadores o (B) autoanticuerpos neutralizadores, tales como HACA.
- 40 La figura 18 muestra ensayos para detectar la presencia de autoanticuerpos neutralizadores tales como HACA.
- La figura 19 muestra perfiles de cambio de movilidad de ADL marcado con FI incubado con suero humano normal (NHS) en presencia de diferentes cantidades de anticuerpo anti-IgG humano. La adición de cantidades crecientes de anticuerpo anti-IgG humano a la mezcla de incubación desplazó de manera dependiente de la dosis el pico de FI-ADL (FA) a las posiciones de elución de masa molecular más alta, C1 y C2, mientras que el control interno (CI) no se desplazó.
- 45 La figura 20 muestra una curva de dosis-respuesta de anticuerpo anti-IgG humano sobre el desplazamiento de FI-ADL libre. Se incubaron cantidades crecientes de anticuerpo anti-IgG humano con 37,5 ng de FI-ADL y control interno. A mayor cantidad de anticuerpo añadida a la mezcla de reacción, menor proporción entre FI-ADL libre y control interno.
- 50 La figura 21 muestra los perfiles de cambio de movilidad de TNF- α marcado con FI incubado con suero humano normal (NHS) en presencia de diferentes cantidades de ADL. Exc.=494 nm; Em.=519 nm. La adición de cantidades crecientes de ADL a la mezcla de incubación desplazó de manera dependiente de la dosis el pico de TNF-FI (FT) a las posiciones de elución de masa molecular más alta, mientras que el control interno (CI) no se desplazó.
- 55 La figura 22 muestra una curva de dosis-respuesta de ADL sobre el desplazamiento de TNF- α -FI libre. Se incubaron cantidades crecientes de ADL con 100 ng de TNF- α -FI y control interno. A mayor cantidad de ADL añadida a la mezcla de reacción, menor proporción entre TNF- α -FI libre y control interno.
- La figura 23 muestra los perfiles de cambio de movilidad de Remicade marcado con FI (IFX) incubado con suero normal (NHS) o suero agrupado de pacientes positivo para HACA.
- 60 La figura 24 muestra los perfiles de cambio de movilidad de HUMIRA marcado con FI (ADL) incubado con suero normal (NHS) o anticuerpo de ratón anti-IgG1 humano.
- La figura 25 muestra los perfiles de cambio de movilidad de HUMIRA marcado con FI (ADL) incubado con suero normal (NHS) o anticuerpo agrupado de pacientes positivo para HAHA.

La figura 26 muestra una ilustración del efecto de la etapa de disociación ácida. "A" representa Remicade marcado; "B" representa HACA, "C" representa Remicade.

La figura 27 muestra el porcentaje de infliximab marcado libre como función de log porcentaje de suero de paciente sin una etapa de disociación ácida.

5 La figura 28 muestra el porcentaje de infliximab marcado libre como función de log porcentaje de suero de paciente sin una etapa de disociación ácida.

La figura 29 muestra los niveles séricos de IFX en un paciente tratado con infliximab como función del tiempo para el caso de paciente nº 1.

10 La figura 30 muestra los niveles séricos de IFX en un paciente tratado con infliximab como función del tiempo para el caso de paciente nº 3.

La figura 31 muestra los niveles séricos de TNF- α en un paciente tratado con infliximab como función del tiempo para el caso de paciente nº 3.

La figura 32 muestra los perfiles de cambio de movilidad de IFX marcado con FI para el caso de paciente nº 1 (A), el caso de paciente nº 2 (B, C) y el caso de paciente nº 4 (D).

15 La figura 33 muestra los perfiles de cambio de movilidad de IFX marcado con FI para el caso de paciente nº 5 (A), el caso de paciente nº 6 (B, C) y el caso de paciente nº 7 (D, E).

La figura 34 muestra los niveles de citoquinas en diferentes grupos de suero de paciente.

20 La figura 35 muestra el análisis de muestras que contienen TNF-Alexa488 y Remicade mediante ensayo de cambio de movilidad utilizando un detector de fluorescencia con configuraciones de ganancia en diferentes valores.

La figura 36 muestra gráficos de isoabsorbancia obtenidos para suero humano normal (panel superior) y TNF-Alexa488 (panel inferior) en fase móvil de HPLC (1X PBS, BSA al 0,1% en agua). Se dibujan las longitudes de onda de excitación en el eje Y y las longitudes de onda de emisión se dibujan en el eje X.

25 La figura 37 muestra el análisis de HPLC de suero humano normal (izquierda) y de 25 ng de TNF-Alexa488 (derecha) detectado con las configuraciones indicadas. El nivel de fondo de fluorescencia del suero humano normal se encuentra muy reducido.

La figura 38 muestra la curva estándar generada mediante análisis de HPLC de muestras que contienen una cantidad fija de TNF-Alexa488 y tituladas con diversas cantidades de Remicade.

30 La figura 39 muestra una comparación entre la determinación de infliximab en muestras clínicas mediante ensayo de cambio de movilidad y mediante ELISA. Los puntos gris oscuro son de muestras positivas para HACA y los puntos gris claro son de muestras negativas para HACA. Las líneas discontinuas representan los límites inferiores de las cuantificaciones para los métodos respectivos.

La figura 40 muestra una comparación entre la determinación de HACA en muestras clínicas mediante ensayo de cambio de movilidad y mediante ELISA.

35 La figura 41 muestra el recuento acumulado de muestras clínicas positivas para HAA determinado mediante ensayo de cambio de movilidad y mediante ELISA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 I. Introducción

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que un ensayo de cambio de movilidad homogénea utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño y la disociación ácida para permitir el equilibrado de los complejos inmunológicos resulta particularmente ventajoso para medir la presencia o el nivel de autoanticuerpos (por ejemplo HACA, HAHA, etc.) que se generan contra los fármacos anti-TNF- α . Dichos autoanticuerpos también se conocen como anticuerpos anti-fármaco o AAF. En consecuencia, la presencia o el nivel de autoanticuerpos contra un fármaco anti-TNF- α administrado en un sujeto que lo necesita puede medirse sin interferencia sustancial del fármaco anti-TNF- α administrado que también se encuentra presente en la muestra del sujeto. En particular, puede incubarse una muestra del sujeto con una cantidad de ácido que resulte suficiente para permitir la medición de la presencia o el nivel de autoanticuerpos en la presencia del fármaco anti-TNF- α sin interferencia sustancial por niveles elevados de fármaco anti-TNF- α .

Los niveles elevados de fármaco anti-TNF- α en una muestra (por ejemplo niveles elevados de infliximab) interfieren con la medición de los niveles de anticuerpo antifármaco (por ejemplo los niveles de HACA). Bajo determinadas condiciones de elevada concentración de fármaco, el anticuerpo antifármaco presente en una muestra se encuentra acomplejado con el fármaco no marcado también presente en la muestra. Al poner en contacto con la muestra un fármaco marcado, por ejemplo infliximab marcado, el anticuerpo antifármaco presente en la muestra resulta cinéticamente bloqueado de formar un complejo con el fármaco marcado. De esta manera, los complejos preformados de anticuerpo antifármaco y el fármaco no marcado interfieren con la medición del anticuerpo antifármaco, que depende de la formación de un complejo entre el anticuerpo antifármaco presente y el fármaco marcado. La etapa de disociación ácida descrita en la presente memoria permite que el anticuerpo antifármaco presente en la muestra se disocie del fármaco no marcado y forme nuevamente complejos tanto con el fármaco marcado como el no marcado. Mediante la disociación del anticuerpo antifármaco del fármaco no marcado, el

anticuerpo antifármaco presente en una muestra puede equilibrarse entre el fármaco marcado y el fármaco no marcado.

5 Tal como se muestra en la figura 27, los niveles elevados de fármaco anti-TNF- α (por ejemplo infliximab) interfieren con la detección de anticuerpos antifármaco (por ejemplo anticuerpos de infliximab o ATI) al llevar a cabo el ensayo de cambio de movilidad sin una etapa de disociación ácida. Sin embargo, la figura 28 muestra que la disociación ácida seguida de cinética de unión en fase solución homogénea para permitir el equilibrio y la nueva formación de complejos inmunológicos incrementó significativamente la tolerancia al fármaco anti-TNF- α de manera que pudieron medirse los anticuerpos antifármaco en presencia de niveles elevados de fármaco anti-TNF- α (por ejemplo de hasta 10 o de por lo menos aproximadamente 60 $\mu\text{g/ml}$). De esta manera, los ensayos resultan particularmente ventajosos respecto a métodos actualmente disponible ya que permiten la detección y la medición de anticuerpos antifármaco en cualquier momento durante la terapia con un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo con independencia de los niveles bajos, intermedios o altos de fármaco anti-TNF- α en una muestra, tal como una muestra de sangre), superando de esta manera una limitación importante de los métodos de la técnica, que requieren la recolección de muestras a 15 concentraciones de valle del fármaco.

En determinados aspectos, el presente método resulta ventajoso porque resuelve y supera las limitaciones actuales asociadas a la administración de fármacos anti-TNF- α tales como el infliximab, en parte mediante la provisión de información útil para guiar las decisiones de tratamiento para aquellos pacientes que reciben o están a punto de 20 recibir terapia de fármacos anti-TNF- α . En particular, los métodos resultan de utilidad para seleccionar una terapia anti-TNF- α apropiada para el tratamiento inicial, para determinar cuándo o cómo ajustar o modificar (por ejemplo incrementar o reducir) la dosis posterior de un fármaco anti-TNF- α para optimizar la eficacia terapéutica y/o reducir la toxicidad, para determinar cuándo o cómo combinar un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo a una dosis inicial, incrementada, reducida o igual) con uno o más agentes inmunosupresores tales como el metotrexato (MTX) o 25 azatioprina (AZA), y/o para determinar cuándo o cómo modificar el curso actual de la terapia (por ejemplo cambiar a un fármaco anti-TNF- α diferente o a un fármaco con diana en un mecanismo diferente).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el presente método resulta particularmente útil en los métodos siguientes de mejora del control del paciente mediante el guiado de las decisiones de tratamiento:

- 30 1. pronóstico de la enfermedad de Crohn: tratamiento de los pacientes que más probablemente se beneficiarán de la terapia.
2. Seguimiento de anticuerpos antiterapéuticos (SAA) + índice de actividad de la enfermedad basado en marcadores biológicos.
- 35 3. Subestratificación de SAA.
4. SAA con modelaje farmacocinético.
5. Seguimiento de la respuesta y predicción del riesgo de recaída:
 - a. Prevención de la terapia de mantenimiento crónico en pacientes con bajo riesgo de recurrencia,
 - b. Marcadores de cicatrización mucosal,
 - 40 c. Selección de terapia: decisión de combinar o no la terapia de fármaco anti-TNF con un agente inmunosupresor tal como MTX o AZA.
6. Selección de pacientes para fármacos biológicos.

II. Definiciones

45 Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos y expresiones siguientes presentan los significados atribuidos a ellos a menos que se indique lo contrario.

Las expresiones "fármaco anti-TNF- α " o "inhibidor de TNF- α " tal como se utilizan en la presente memoria pretenden comprender agentes que incluyen proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, proteínas de fusión (por 50 ejemplo proteínas de fusión de Ig o proteínas de fusión de Fc), proteínas de unión multivalentes (por ejemplo DVD Ig), antagonistas de TNF- α de molécula pequeña y moléculas de origen natural o no natural similares y/o formas recombinantes y/o manipuladas de las mismas que, directa o indirectamente, inhiben la actividad de TNF- α , tal como mediante la interacción de TNF- α , tal como la interacción de TNF- α con un receptor de superficie celular para TNF- α , la inhibición de la producción de proteína TNF- α , la inhibición de la expresión génica de TNF- α , la inhibición de la secreción de TNF- α de las células, la inhibición de la señalización del receptor de TNF- α o cualesquiera otros 55 medios que resulten en una menor actividad de TNF- α en un sujeto. La expresión "fármaco anti-TNF- α " o "inhibidor de TNF- α " preferentemente incluye agentes que interfieren con la actividad de TNF- α . Entre los ejemplos de fármacos anti-TNF- α se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, infliximab (REMICADETM, Johnson and Johnson), anticuerpo monoclonal humano anti-TNF adalimumab (D2E7/HUMIRATM, Abbott Laboratories), etanercept (ENBRELTM, Amgen), certolizumab pegol (CIMZIA[®], UCB, Inc.), golimumab (SIMPONI[®], CNTO 148), CDP 517 (Celltech), CDP 870 (Celltech), así como otros compuestos que inhiben la actividad de TNF- α , de manera que al 60 administrarlos en un sujeto que sufre o presenta un riesgo de sufrir un trastorno en el que la actividad de TNF- α resulta perjudicial (por ejemplo la AR), se trata el trastorno.

5 El término "TNF- α " pretende incluir una citoquina humana que existe como forma secretada de 17 kDa y una forma asociada a membrana de 26 kDa, la forma biológicamente activa de la cual está compuesta de un trímero de moléculas de 17 kDa unidas no covalentemente. La estructura de TNF- α se describe adicionalmente en, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 338:225-228, 1989. El término TNF- α pretende incluir el TNF- α humano, un TNF- α humano recombinante (rhTNF- α) o TNF- α que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 80% respecto a la proteína TNF- α humana. El TNF- α humano consiste de un dominio citoplasmático de 35 aminoácidos (aa), un segmento transmembranal de 21 aa y un dominio extracelular (DEC) de 177 a (Pennica D. *et al.*, Nature 312:724, 1984). En el DEC, el TNF- α humano comparte una identidad de secuencia de aa de 97% con el TNF- α de rhesus, y una identidad de secuencia de aa de 71% a 92% con TNF- α bovino, canino, de rata del algodón, equino, felino, de ratón, porcino y de rata. Puede prepararse TNF- α mediante métodos de expresión recombinante estándares u obtenerse comercialmente (R&D Systems, n° de catálogo 210-TA, Minneapolis, Minn.).

15 El término "TNF- α " puede referirse a un "antígeno", que incluye una molécula o una parte de la molécula capaz de ser ligado por un fármaco anti-TNF- α . TNF- α puede presentar uno o más epítopos. En determinados casos, TNF- α reaccionará, de manera altamente selectiva, con un anticuerpo anti-TNF- α . Entre los antígenos preferentes que se unen a anticuerpos, fragmentos y regiones de anticuerpos anti-TNF- α se incluyen por lo menos 5 aminoácidos de TNF- α humano. En determinados casos, TNF- α presenta una longitud suficiente y un epítipo de TNF- α que es capaz de unirse a anticuerpos anti-TNF- α y a fragmentos y regiones de los mismos.

20 La expresión "que predice la sensibilidad a un fármaco anti-TNF- α " pretende referirse a una capacidad de evaluar la probabilidad de que el tratamiento de un sujeto con un fármaco anti-TNF- α resulte o no eficaz en el sujeto (por ejemplo que proporcione un beneficio medible). En particular, dicha capacidad de evaluar la probabilidad de que el tratamiento resultará o no efectivo típicamente se utiliza después de iniciar el tratamiento y se ha observado en el sujeto un indicador de efectividad (por ejemplo un indicador de beneficio medible). Los fármacos anti-TNF- α particularmente preferentes son agentes biológicos que han sido autorizados por la FDA para la utilización en seres humanos en el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por TNF- α y entre ellos se incluye los fármacos anti-TNF- α indicados en la presente memoria.

30 La expresión "cromatografía de exclusión por tamaño" o "CET" incluye un método cromatográfico en el que se separan moléculas en solución basándose en su tamaño y/o volumen hidrodinámico. Se aplica a moléculas grandes o a complejos macromoleculares tales como proteínas y sus conjugados. Típicamente, al utilizar una solución acuosa para transportar la muestra por la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración en gel.

35 Los términos "complejo", "inmunocomplejo", "conjugado" e "inmunoconjugado" incluyen, aunque sin limitarse a ellos, TNF- α unido (por ejemplo por medios no covalentes) a un fármaco anti-TNF- α , un fármaco anti-TNF- α unido (por ejemplo por medios no covalentes) a un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α y un fármaco anti-TNF- α unido (por ejemplo por medios no covalentes) tanto a TNF- α como a un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α .

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, una entidad que se modifica con el término "marcado" incluye cualquier entidad, molécula, proteína, enzima, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, citoquina o especie relacionada que se conjuga con otra molécula o entidad química que es detectable empíricamente. Entre las especies químicas adecuadas como marcajes para entidades marcadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, pigmentos fluorescentes, por ejemplo pigmentos Alexa Fluor[®] tales como Alexa Fluor[®] 647, puntos cuánticos, pigmentos ópticos, pigmentos luminiscentes y radionucleidos, por ejemplo ¹²⁵I.

50 La expresión "cantidad eficaz" incluye una dosis de un fármaco que es capaz de conseguir un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesita, así como la cantidad biodisponible de un fármaco. El término "biodisponible" incluye la fracción de una dosis administrada de un fármaco que se encuentra disponible para la actividad terapéutica. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un fármaco útil para tratar enfermedades y trastornos en los que se ha implicado TNF- α en la fisiopatología podría ser la cantidad capaz de prevenir o aliviar uno o más de los síntomas asociados a la misma.

55 La expresión "detección de marcaje de fluorescencia" incluye un medio para detectar un marcaje fluorescente. Entre los medios de detección se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un espectrómetro, un fluorímetro, un fotómetro y un dispositivo de detección incorporado comúnmente en un instrumento cromatográfico, tal como, aunque sin limitarse a ellos, cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño, tal como, aunque sin limitación, el sistema de HPLC Agilent-1200.

60 La expresión "optimizar la terapia" incluye optimizar la dosis (por ejemplo la cantidad o el nivel eficaz) y/o el tipo de una terapia particular. Por ejemplo, optimizar la dosis de un fármaco anti-TNF- α incluye incrementar o reducir la cantidad del fármaco anti-TNF- α posteriormente administrado en un sujeto. En determinados casos, optimizar le tipo de fármaco anti-TNF- α incluye cambiar el fármaco anti-TNF- α administrado por otro fármaco diferente (por ejemplo

un fármaco anti-TNF- α diferente). En otros casos, optimizar la terapia incluye coadministrar una dosis de un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo a una dosis incrementada, reducida o a la misma dosis que la dosis previa) en combinación con un fármaco inmunosupresor.

- 5 El término "coadministrar" incluye administrar más de un agente activo de manera que la duración del efecto fisiológico de un agente activo se solape con el efecto fisiológico de un segundo agente activo.

El término "sujeto", "paciente" o "individual" típicamente se refiere a seres humanos, aunque también a otros animales, incluyendo, por ejemplo, otros primates, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

- 10 La expresión "curso de terapia" incluye cualquier enfoque terapéutico que se sigue para aliviar o prevenir uno o más síntomas asociados a una enfermedad o trastorno mediado por TNF- α . La expresión comprende administrar cualquier compuesto, fármaco, procedimiento y/o régimen útil para mejorar la salud de un individuo con una enfermedad o trastorno mediado por TNF- α e incluye cualquiera de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria. El experto en la materia apreciará que el curso de terapia o la dosis del curso de terapia actual puede modificarse (por ejemplo incrementarse o reducirse) basándose en la presencia o el nivel de concentración de TNF- α , del fármaco anti-TNF- α y/o del anticuerpo antifármaco utilizando los métodos.

- 20 La expresión "fármaco inmunosupresor" o "agente inmunosupresor" incluye cualquier sustancia capaz de producir un efecto inmunosupresor, por ejemplo la prevención o la disminución de la respuesta inmunológica, tal como mediante irradiación o mediante la administración de fármacos tales como antimetabolitos, sueros antilinfocitarios, anticuerpos, etc. Entre los ejemplos de fármacos inmunosupresores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, fármacos tiopurina tales como la azatioprina (AZA) y metabolitos de la misma, antimetabolitos tales como el metotrexato (MTX), sirolimus (rapamicina), temsirolimus, everolimus, tacrolimus (FK-506), FK-778, anticuerpos globulina anti-linfocito, anticuerpos globulina anti-timocito, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD4 y conjugados de anticuerpo-toxina, ciclosporina, micofenolato, monofosfato de mizoribina, escoparona, acetato de glatirámico, metabolitos de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, profármacos de los mismos y combinaciones de los mismos.

- 30 La expresión "fármaco tiopurina" incluye azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP) o cualquier metabolito de los mismos que presente eficacia terapéutica e incluye, aunque sin limitarse a ellos, 6-tioguanina (6-TG), 6-metilmercaptopurina ribósido, nucleótidos 6-tioinosina (por ejemplo monofosfato de 6-tioinosina, difosfato de 6-tioinosina, trifosfato de 6-tioinosina), nucleótidos 6-tioguanina (por ejemplo monofosfato de 6-tioguanosina, difosfato de 6-tioguanosina, trifosfato de 6-tioguanosina), nucleótidos 6-tioxantoxina (por ejemplo monofosfato de 6-tioxantosina, difosfato de 6-tioxantosina, trifosfato de 6-tioxantosina), derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

- 40 El término "muestra" incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un individuo. Entre las muestras se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células polimorfonucleares (PMN)), líquido de lavado ductal, aspirado de fluido del pezón, líquido linfático (por ejemplo células tumorales diseminadas del nódulo linfático), aspirado de médula ósea, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), esputo, líquido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado con aguja fina (por ejemplo recolectado mediante aspiración aleatoria periareolar con aguja fina), cualquier otro líquido corporal, una muestra de tejido, tal como una biopsia de un sitio de inflamación (por ejemplo biopsia con aguja), extractos celulares de la misma y una fracción enriquecida en inmunoglobulinas derivada de uno o más de dichos líquidos o tejidos corporales. La muestra puede ser de sangre completa, una fracción componente de la misma, tal como plasma, suero o un pellet celular, o una fracción enriquecida en inmunoglobulinas de la misma. El experto en la materia apreciará que previamente al análisis pueden diluirse las muestras, tal como las muestras de suero. La muestra puede obtenerse mediante aislamiento de células PBMC y/o PMN utilizando cualquier técnica conocida. La muestra puede ser una biopsia de tejido, tal como, por ejemplo, de un sitio de inflamación tal como una parte del tracto gastrointestinal o tejido sinovial.

- 50 Las etapas de los métodos no deben llevarse a cabo necesariamente en el orden particular en el que se presentan. Un experto ordinario en la materia entenderá que se encuentran comprendidos otras ordenaciones de las etapas de los métodos.

Los corchetes, "[]" indican que se hace referencia a la especie dentro de los corchetes por su concentración.

60 III. Descripciones

Se dan a conocer ensayos para detectar y medir la presencia o el nivel de autoanticuerpos contra terapéuticos farmacológicos anti-TNF- α en una muestra. El presente método resulta útil para optimizar la terapia y realizar un seguimiento de los pacientes que reciben terapéuticos farmacológicos anti-TNF- α para la detección de la presencia

o el nivel de autoanticuerpos (por ejemplo HACA y/o HAHA) contra el fármaco. Se dan a conocer métodos para seleccionar la terapia, optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en sujetos que reciben fármacos anti-TNF- α para el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por TNF- α .

5 Se da a conocer un método para detectar la presencia o el nivel de un autoanticuerpo contra un fármaco anti-TNF- α en una muestra sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra con un ácido para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α , en el que la muestra presenta o se sospecha que presenta un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α ,

10 (b) poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado tras la disociación de los complejos preformados,

(c) neutralizar el ácido en la muestra para formar complejos marcados (es decir inmunocomplejos o conjugados) del fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo (es decir, en el que el fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo no se encuentran unidos entre sí covalentemente),

15 (d) someter los complejos marcados a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los complejos marcados (por ejemplo de fármaco anti-TNF- α marcado libre), y

(e) detectar los complejos marcados, detectando de esta manera la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra.

20 Sin restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que la disociación ácida cambia el K_D entre el autoanticuerpo (también conocido como anticuerpo antifármaco o ADA) y el fármaco anti-TNF- α . En particular, se plantea la teoría de que la disociación ácida rompe los enlaces entre ADA y el fármaco anti-TNF- α . Entre estos enlaces se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos, fuerzas de van der Waals y/o enlaces hidrofóbicos. La adición de ácido incrementa el pH y, de esta manera, se incrementa la concentración de iones de hidrógeno. Los iones de hidrógeno ahora pueden competir para las interacciones no covalentes anteriormente indicadas. Esta competición rebaja la K_D entre ADA y el fármaco anti-TNF- α .

Se da a conocer que el fármaco anti-TNF- α puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de REMICADETM (infliximab), ENBRELTM (etanercept), HUMIRATM (adalimumab), CIMZIA[®] (certolizumab pegol), SIMPONI[®] (golimumab, CNTO 148) y combinaciones de los mismos.

Se da a conocer que el autoanticuerpo de fármaco anti-TNF- α incluye, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos antiquméricos humanos (HACA), anticuerpos humanos antihumanizados (HAHA) y anticuerpos humanos antiratón (HAMA), así como combinaciones de los mismos.

Se da a conocer que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo simultáneamente, por ejemplo las muestras se ponen en contacto con un ácido y un fármaco anti-TNF- α marcado simultáneamente. La etapa (b) puede llevarse a cabo antes de la etapa (a), por ejemplo la muestra en primer lugar se pone en contacto con un fármaco anti-TNF- α marcado y después se pone en contacto con un ácido. Las etapas (b) y (c) pueden llevarse a cabo simultáneamente, por ejemplo la muestra se pone en contacto con un fármaco anti-TNF- α marcado y se neutraliza (por ejemplo mediante el contacto de la muestra con uno o más agentes neutralizadores) simultáneamente.

La muestra puede ponerse en contacto con una cantidad de un ácido que resulte suficiente para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α de manera que el fármaco anti-TNF- α marcado, el fármaco anti-TNF- α no marcado y el autoanticuerpo del fármaco anti-TNF- α puedan equilibrarse y formar complejos entre ellos.

Los métodos pueden comprender la detección de la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia sustancial del fármaco anti-TNF- α que también se encuentra presente en la muestra. La muestra puede ponerse en contacto con una cantidad de un ácido que resulte suficiente para permitir la detección y/o la medición del autoanticuerpo en presencia de un nivel elevado del fármaco anti-TNF- α .

Se da a conocer que la expresión "nivel elevado de un fármaco anti-TNF- α " puede incluir niveles de fármaco de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mg/ml, de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80 mg/ml, de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70 mg/ml, o de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 mg/ml. La expresión "nivel elevado de un fármaco anti-TNF- α " puede incluir niveles de fármaco superiores o iguales a aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/ml.

El ácido puede comprender un ácido orgánico. El ácido puede comprender un ácido inorgánico. El ácido puede comprender una mezcla de un ácido orgánico y un ácido inorgánico. Entre los ejemplos no limitativos de ácidos orgánicos se incluyen ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glutámico, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico, ácido trifluoroacético, ácido bencenosulfónico, ácido aminometanosulfónico, ácido canfor-10-sulfónico, ácido cloroacético, ácido bromoacético, ácido yodoacético, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido

glicérico, ácido succínico, ácido málico, ácido aspártico y combinaciones de los mismos. Entre los ejemplos no limitativos de ácidos inorgánicos se incluyen ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico y combinaciones de los mismos.

5 La cantidad de un ácido puede corresponder a una concentración de entre aproximadamente 0,01 M y aproximadamente 10 M, entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 5 M, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 0,2 M y aproximadamente 1 M o entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,75 M de un ácido o de una mezcla de ácidos. La cantidad de un ácido puede corresponder a una concentración superior o igual a aproximadamente 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7
10 M, 0,8 M, 0,9 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, 8 M, 9 M ó 10 M de un ácido o de una mezcla de ácidos. El pH del ácido puede ser de, por ejemplo, aproximadamente 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 ó 6,5.

15 La muestra puede ponerse en contacto con un ácido durante un periodo de tiempo que resulte suficiente para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y del fármaco anti-TNF- α . En determinados casos, la muestra se pone en contacto (por ejemplo se incubaba) con un ácido durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 0,1 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 0,2 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 5 horas, o entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 2 horas. En otros casos, la
20 muestra se pone en contacto (por ejemplo se incubaba) con un ácido durante un periodo de tiempo superior o igual a aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 horas. La muestra puede ponerse en contacto con un ácido a 4°C, a temperatura ambiente (TA) o a 37°C.

25 La etapa de neutralización del ácido puede comprender elevar el pH de la muestra para permitir la formación de complejos entre el fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α así como de los complejos entre fármaco anti-TNF- α no marcado y el autoanticuerpo. El ácido puede neutralizarse mediante la adición de uno o más agentes neutralizadores tales como, por ejemplo, bases fuertes, bases débiles, soluciones tampón y combinaciones de los mismos. El experto en la materia apreciará que las reacciones de neutralización no implican necesariamente un pH resultante de 7. En algunos casos la neutralización del ácido resulta en una muestra que es básica. En otros casos, la neutralización del ácido resulta en una muestra que es ácida (aunque de pH superior al de la muestra antes de la adición del agente neutralizador). El agente neutralizador puede comprender un
30 tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo 10x PBS) a una pH de aproximadamente 7,3.

35 La etapa (b) puede comprender además poner en contacto un control interno con la muestra conjuntamente con un fármaco anti-TNF- α marcado (por ejemplo antes, durante o después de la disociación de los complejos preformados). En determinados casos, el control interno comprende un control interno marcado, tal como, por ejemplo, biocitina-Alexa488. En otros casos determinados, la cantidad del control interno marcado se encuentra comprendida entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 25 ng, entre aproximadamente 5 ng y aproximadamente 25 ng, entre aproximadamente 5 ng y aproximadamente 20 ng, entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 20 ng, entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 10 ng, o entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 5 ng por cada 100 ml de muestra analizada. En otros casos, la cantidad del control interno marcado es superior o igual a aproximadamente 1 ng, 5 ng, 10 ng, 15 ng, 20 ng ó 25 ng por cada 100 ml de muestra analizada.

45 A modo de ejemplo no limitativo de los métodos, pueden incubarse muestras, tales como muestras de suero (por ejemplo suero de sujetos que reciben terapia con un fármaco anti-TNF- α , tal como Remicade (IFX)) con ácido cítrico 0,5 M, pH 3,0, durante una hora a temperatura ambiente. Tras la disociación de los complejos preformados entre fármaco anti-TNF- α (no marcado) y autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α (por ejemplo anticuerpo antifármaco tales como anticuerpos anti-IFX (AAI)), puede añadirse fármaco anti-TNF- α marcado (por ejemplo IFX-Alexa488) y un control interno y neutralizarse la mezcla de reacción (por ejemplo inmediatamente) con un agente neutralizador, tal como 10x PBS, pH 7,3. Tras la neutralización, la mezcla de reacción puede incubarse durante otra hora a temperatura ambiente (por ejemplo en un agitador de placas) para permitir el equilibrado y completar la reformación de complejos inmunológicos entre el fármaco anti-TNF- α marcado o no marcado y el anticuerpo antifármaco. A continuación, las muestras pueden filtrarse y analizarse mediante HPLC-CET tal como se indica en la presente
50 memoria.

60 Los métodos (por ejemplo que comprenden la disociación ácida seguido de cinética de unión en fase solución homogénea) pueden incrementar significativamente la tolerancia al fármaco IFX de manera que la AAI puede medirse en presencia de IFX hasta aproximadamente 60 mg/ml. Ver el Ejemplo 14 y las figuras 27 y 28. En otras palabras, los métodos pueden detectar la presencia o el nivel de autoanticuerpos contra fármacos anti-TNF- α , tales como AAI, así como autoanticuerpos contra otros fármacos anti-TNF- α en presencia de niveles elevados de fármacos anti-TNF- α (por ejemplo IFX) aunque sin interferencia sustancial de los mismos.

Se da a conocer un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad de un fármaco anti-TNF- α en un sujeto que recibe un curso de terapia con el fármaco anti-TNF- α , comprendiendo el método:

(a) detectar la presencia o el nivel de un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α en una muestra del sujeto sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, comprendiendo el método:

(i) poner en contacto la muestra con un ácido para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α , en el que la muestra presenta o se sospecha que presenta un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α ,

(ii) poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado tras la disociación de los complejos preformados,

(iii) neutralizar el ácido en la muestra para formar complejos marcados (es decir inmunocomplejos o conjugados) del fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo (es decir, en el que el fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo no se encuentran unidos entre sí covalentemente),

(iv) someter los complejos marcados a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los complejos marcados (por ejemplo de fármaco anti-TNF- α marcado libre), y

(v) detectar los complejos marcados (detectando de esta manera, por ejemplo, la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra), y

(b) determinar una dosis posterior del curso de terapia para el sujeto o si debería administrarse un curso de terapia diferente en el sujeto basándose en la presencia o el nivel del autoanticuerpo, optimizando de esta manera la terapia y/o reduciendo la toxicidad del fármaco anti-TNF- α .

La dosis posterior del curso de terapia puede incrementarse, reducirse o mantenerse basándose en la presencia o el nivel del autoanticuerpo. A modo de ejemplo no limitativo, una dosis posterior del curso de terapia se reduce la detectar un nivel elevado del autoanticuerpo en la muestra. El curso de terapia diferente puede comprender un fármaco anti-TNF- α diferente, el curso de terapia actual conjuntamente con un agente inmunosupresor, o cambiar a un curso de terapia que no sea un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo interrumpir la utilización de un anticuerpo terapéutico anti-TNF- α). A modo de ejemplo no limitativo, se administra un curso de terapia diferente al detectar un nivel elevado del autoanticuerpo en la muestra.

Las etapas (i) e (ii) pueden llevarse a cabo simultáneamente, por ejemplo, la muestra se pone en contacto con un ácido y un fármaco anti-TNF- α marcado simultáneamente. La etapa (ii) puede llevarse a cabo antes de la etapa (i), por ejemplo la muestra en primer lugar se pone en contacto con un fármaco anti-TNF- α marcado y después se pone en contacto con un ácido. Las etapas (ii) e (iii) pueden llevarse a cabo simultáneamente, por ejemplo la muestra se pone en contacto con un fármaco anti-TNF- α marcado y se neutraliza (por ejemplo mediante el contacto de la muestra con uno o más agentes neutralizadores) simultáneamente.

Puede marcarse un fármaco anti-TNF- α con cualquiera de entre una diversidad de grupos detectables. Un fármaco anti-TNF- α puede marcarse con un fluoróforo o un pigmento fluorescente. Entre los ejemplos no limitativos de fluoróforos o pigmentos fluorescentes se incluyen los listados en el catálogo de sondas molecular (ver R. Haugland, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10a edición, Molecular probes, Inc., 2005). Entre dichos fluoróforos o pigmentos fluorescentes ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, pigmentos Alexa Fluor[®] tales como Alexa Fluor[®] 350, Alexa Fluor[®] 405, Alexa Fluor[®] 430, Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 514, Alexa Fluor[®] 532, Alexa Fluor[®] 546, Alexa Fluor[®] 555, Alexa Fluor[®] 568, Alexa Fluor[®] 594, Alexa Fluor[®] 610, Alexa Fluor[®] 633, Alexa Fluor[®] 635, Alexa Fluor[®] 647, Alexa Fluor[®] 660, Alexa Fluor[®] 680, Alexa Fluor[®] 700, Alexa Fluor[®] 750 y/o Alexa Fluor[®] 790, así como otros fluoróforos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, cloruro de dansilo (DNS-Cl), 5-(yodoacetamida)fluorosceína (5-IAF), 5-isotiocianato de fluorosceína (FITC), 5- (y 6-) isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno (Acrylodan), cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD-Cl), bromuro de etidio, amarillo Lucifer, hidrocioruro de 5-carboxirrodamina 6G, lisamina-rodamina B cloruro de sulfonilo, Texas Red[™] cloruro de sulfonilo, BODIPY[™], ácidos naftalamina-sulfónicos (por ejemplo, ácido 1-anilinaftalén-8-sulfónico (ANS), ácido 6-(p-toluidinil)naftalén-e-2-sulfónico (TNS) y similares), antroil-ácido graso, DPH, ácido parinárico, TMA-DPH, fluorenil-ácido graso, fluoresceína-fosfatidiletanolamina, Texas Red-fosfatidiletanolamina, pirenil-fosfatidilcolina, fluorenil-fosfatidilcolina, merocianina 540, 1-(3-sulfonatopropil)-4-[β -[2[(di-n-butilamino)-6 naftil]vinil]piridinio betaína (naftilo estirilo), 3,3'dipropiltiadicarbocianina (diS-C₃-(5)), 4-(p-dipentil-aminoestiril)-1-metilpiridinio (di-5-ASP), Cy-3 yodoacetamida, Cy-5-N-hidroxisuccinimida, Cy-7-Isotiocianato, rodamina 800, IR-125, naranja tiazol, Azure B, Nilo azul, ftalocianina de Al, oxaxín-1,4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, naranja acridina, homodímero de etidio, N(etoxicarbonilmetil)-6-metoxiquinolinio (MQAE), Fura-2, verde calcio, carboxi SNARF-6, BAPTA, coumarina, fitofluores, coroneno, complejos de metal-ligando, IRDye[®] 700DX, IRDye[®] 700, IRDye[®] 800RS, IRDye[®] 800CW, IRDye[®] 800, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY 676, DY680, DY682, DY780, y mezclas de los mismos. Entre los fluoróforos adecuados adicionales se incluyen cofactores enzimáticos, lantánido, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente roja o mutantes y derivados de los mismos. El segundo elemento de la pareja de unión específica puede presentar un grupo detectable unido al mismo.

Típicamente el grupo fluorescente es un fluoróforo seleccionado de entre la categoría de pigmentos que comprende polimetinas, ftalocianinas, cianinas, xantenos, fluorenos, rodaminas, coumarinas, fluoresceínas y BODIPY™.

5 El grupo fluorescente puede ser un fluoróforo de infrarrojo cercano (FIC) que emite en el intervalo de entre aproximadamente 650 y aproximadamente 900 nm. La utilización de tecnología de fluorescencia de infrarrojo cercano resulta ventajosa en ensayos biológicos ya que elimina o reduce sustancialmente el fondo de la autofluorescencia de los sustratos biológicos. Otro beneficio de la tecnología de fluorescencia de IR cercano es que la luz dispersada de la fuente de excitación se reduce en gran medida ya que la intensidad de dispersión es proporcional a la cuarta potencia inversa de la longitud de onda. Una fluorescencia de fondo reducida y una baja dispersión resultan en una elevada proporción de señal a ruido, lo que resulta esencial para una detección altamente sensible. Además, la ventana ópticamente transparente en la región de IR cercano (650 nm a 900 nm) en tejidos biológicos convierte a la fluorescencia de IRC en una tecnología valiosa para la obtención de imágenes *in vivo* y aplicaciones de detección subcelular que requieren la transmisión de luz a través de componentes biológicos. El grupo fluorescente preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de IRDye® 700DX, IRDye® 700, IRDye® 800RS, IRDye® 800CW, IRDye® 800, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY 676, DY680, DY682 y DY780 El grupo de infrarrojo cercano puede ser IRDye® 800CW, IRDye® 800, IRDye® 700DX, IRDye® 700 ó Dynamic DY676

20 El marcaje fluorescente se lleva a cabo utilizando un derivado químicamente reactivo de un fluoróforo. Entre los grupos reactivos comunes se incluyen derivados reactivos de isotiocianato, tales como FITC y TRITC (derivados de fluoresceína y rodamina), ésteres de succinimidilo reactivos con aminas, tales como NHS-fluoresceína y compuestos fluorados activados por maleimida reactivos con sulfhidrilo, tales como fluoresceín-5-maleimida, muchos de los cuales se encuentran disponibles comercialmente. La reacción de cualquiera de dichos pigmentos reactivos con un fármaco anti-TNF- α resulta en un enlace covalente estable que se forma entre el fluoróforo y el fármaco anti-TNF- α .

25 En determinados casos, tras una reacción de marcaje fluorescente, con frecuencia resulta necesario eliminar cualquier fluoróforo no reaccionado de la molécula diana marcada. Con frecuencia lo anterior se consigue mediante cromatografía de exclusión por tamaño, aprovechando la diferencia de tamaños entre el fluoróforo y la proteína marcada.

30 Los pigmentos fluorescentes reactivos se encuentran disponibles de muchas fuentes. Pueden obtenerse con diferentes grupos reactivos para la unión a diversos grupos funcionales dentro de la molécula diana. También se encuentran disponibles en kits de marcaje que contienen todos los componentes para llevar a cabo una reacción de marcaje. En un aspecto preferente, se utiliza maleimida Alexa Fluor® 647 C2 de Invitrogen (nº de cat. A-20347).

35 La unión inmunológica específica de un anticuerpo antifármaco (AAF) a un fármaco anti-TNF- α puede detectarse directa o indirectamente. Entre los marcajes directos se incluyen las etiquetas fluorescentes o luminiscentes, los metales, los pigmentos, los radionucleidos y similares, unidos al anticuerpo. En determinados casos, puede utilizarse un fármaco anti-TNF- α marcado con yodo 125 (^{125}I) para determinar los niveles de concentración de AAF en una muestra. En otros casos, un ensayo de quimioluminiscencia utilizando un fármaco anti-TNF- α quimioluminiscente que es específico para AAF en una muestra resulta adecuado para la detección no radioactiva sensible de los niveles de concentración de AAF. En casos particulares, también resulta adecuado un fármaco anti-TNF- α marcado con un fluorocromo para determinar los niveles de concentración de AAF en una muestra. Entre los ejemplos de fluorocromos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, pigmentos Alexa Fluor®, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Pueden obtenerse comercialmente anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos, por ejemplo, F(ab')₂ de cabra anti-IgG humano-FITC se encuentra disponible de Tago Immunologicals (Burlingame, CA).

50 Entre los marcajes indirectos se incluyen diversos enzimas bien conocidos de la técnica, tales como la peroxidasa de rábano picante (PRP), la fosfatasa alcalina (FA), la β -galactosidasa, la urea y similares. Puede utilizarse un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que rinde un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Puede utilizarse un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo, por ejemplo, que rinde un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, puede utilizarse un sistema de detección de β -galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), que rinde un producto soluble fácilmente detectable a 410 nm. Puede utilizarse un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como urea-azul bromocresol (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Puede obtenerse un anticuerpo secundario útil unido a una enzima a partir de varias fuentes comerciales, por ejemplo F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana-fosfatasa alcalina puede obtenerse de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

60 Puede analizarse una señal procedente del marcaje directo o indirecto utilizando, por ejemplo, un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección de ^{125}I , o un fluorímetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz de una

determinada longitud de onda. Para la detección de anticuerpos unidos a enzima, puede llevarse a cabo un análisis cuantitativo de los niveles de AAF utilizando un espectrofotómetro, tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices, Menlo Park, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos pueden automatizarse o ejecutarse robóticamente, y puede detectarse simultáneamente la señal de múltiples muestras.

5 Puede utilizarse la cromatografía de exclusión por tamaño. El principio subyacente de la CET es que las partículas de diferentes tamaños eluyen (se filtran) a través de una fase estacionaria a diferentes velocidades. Ello resulta en la separación de una solución de partículas basándose en el tamaño. Con la condición de que todas las partículas se carguen simultáneamente o prácticamente de manera simultánea, las partículas del mismo tamaño eluyen juntas.
 10 Cada columna de exclusión por tamaño presenta un abanico de pesos moleculares que pueden separarse. El límite de exclusión define el peso molecular en el extremo superior de dicho abanico y es donde las moléculas son excesivamente grandes para resultar atrapadas en la fase estacionaria. El límite de permeación define el peso molecular en el extremo inferior del abanico de separación y es donde las moléculas de un tamaño suficientemente pequeño pueden penetrar en los poros de la fase estacionaria por completo y todas las moléculas bajo dicha masa molecular son tan pequeñas que eluyen como una única banda.

En determinados aspectos, se recoge el eluyente en volúmenes constantes, o fracciones. Cuanto más similares de tamaño sean las partículas, más probablemente se encontrarán en la misma fracción y no se detectarán separadas. Preferentemente, las fracciones recogidas se examinan mediante técnicas espectroscópicas para determinar la concentración de las partículas eluidas. Típicamente, entre las técnicas de detección espectroscópica útiles en el presente método se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la fluorimetría, el índice refractivo (IR) y la luz ultravioleta (UV). En determinados casos, el volumen de elución disminuye de manera aproximadamente lineal con el logaritmo del volumen hidrodinámico molecular (es decir, las fracciones más pesadas eluyen las primeras).

25 Se da a conocer un kit para detectar la presencia o el nivel de autoanticuerpos contra un fármaco anti-TNF- α en una muestra. El kit puede comprender uno o más de los componentes siguientes: un ácido (o mezcla de ácidos), un fármaco anti-TNF- α marcado (por ejemplo un anticuerpo anti-TNF- α marcado), un control interno marcado, un agente neutralizador (o mezclas del mismo), medios para la detección (por ejemplo un detector de fluorescencia), una cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (HPLC-ET) y/o instrucciones para la
 30 utilización del kit.

Se da a conocer además un método para seleccionar un curso de terapia (por ejemplo para seleccionar un fármaco anti-TNF- α apropiado) para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por TNF- α en un sujeto, comprendiendo el método:

- 35 (a) analizar una muestra obtenida del sujeto para determinar la presencia, el nivel o el genotipo de uno o más marcadores en la muestra,
 (b) aplicar un algoritmo estadístico a la presencia, nivel o genotipo de uno o más marcadores determinados en la etapa (a) para generar un índice de actividad/gravedad de la enfermedad, y
 40 (c) seleccionar un curso de terapia apropiado (por ejemplo una terapia anti-TNF- α) para el sujeto basándose en el índice de actividad/gravedad de la enfermedad.

Se da a conocer un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en sujeto que recibe un curso de terapia para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por TNF- α , comprendiendo el método:

- 45 (a) analizar una muestra obtenida del sujeto para determinar la presencia, el nivel o el genotipo de uno o más marcadores en la muestra,
 (b) aplicar un algoritmo estadístico a la presencia, nivel o genotipo de uno o más marcadores determinados en la etapa (a) para generar una actividad de enfermedad/índice de gravedad, y
 50 (c) determinar una dosis posterior del curso de terapia para el sujeto o si debería administrarse un curso de terapia diferente en el sujeto basándose en el índice de actividad/gravedad de la enfermedad.

El curso de la terapia puede comprender un anticuerpo anti-TNF- α . En determinados casos, el anticuerpo anti-TNF α es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de REMICADETM (infliximab), ENBRELTM (etanercept), HUMIRATM (adalimumab), CIMZIA[®] (certolizumab pegol), SIMPONI[®] (golimumab, CNTO 148) y combinaciones de los mismos. El curso de la terapia puede comprender un anticuerpo anti-TNF- α conjuntamente con un agente
 55 inmunosupresor.

El nivel de uno o más marcadores puede comprender un nivel total, un nivel de activación o combinaciones de los mismos. En casos particulares, el marcador o marcadores son elementos seleccionados de entre el grupo que consiste de un marcador inflamatorio, un factor de crecimiento, un marcador serológico, una citoquina y/o
 60 quimoquina, un marcador de estrés oxidativo, un receptor de superficie celular, un marcador de ruta de señalización, un marcador genético, un anticuerpo anti-TNF- α , un anticuerpo antifármaco (AAF) y combinaciones de los mismos.

5 En algunos casos, el marcador inflamatorio es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de CRP, SAA, VCAM, ICAM, calprotectina, lactoferrina, IL-8, Rantes, TNF- α , IL-6, IL-1 β , S100A12, M2-piruvato quinasa (PK), IFN, IL-2, TGF, IL-13, IL-15, IL-12 y combinaciones de los mismos. En otros casos, el factor de crecimiento es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de GM-CSF, VEGF, EGF, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, FGF7) y combinaciones de los mismos. En todavía otros casos, el marcador serológico es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti-neutrófilos, un anticuerpo antimicrobiano, un anticuerpo anti-*Saccharomyces cerevisiae* y combinaciones de los mismos. En casos adicionales, la citoquina es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-10 y combinaciones de los mismos. En otros casos, el receptor de superficie celular es CD64. En todavía otros casos, el marcador de la ruta de señalización es una molécula de transducción de señales. En otros casos, el marcador genético es una mutación en un gen de la ruta inflamatoria.

15 La etapa (a) puede comprender la determinación de la presencia, el nivel y/o el genotipo de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, quince, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta o más marcadores en la muestra. En determinados casos, la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma, sangre completa, heces, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células polimorfonucleares (PMN) y una biopsia de tejido.

20 El algoritmo estadístico puede comprender un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. En algunos casos, el sistema clasificador estadístico de aprendizaje se selecciona de entre el grupo que consiste de un bosque aleatorio, árbol de clasificación y regresión, árbol de decisión ampliado, redes neuronales, máquina de vectores de soporte, modelo detector general de interacción automática de chi-cuadrado, árbol interactivo, curva spline de regresión multiadaptativa, clasificador de aprendizaje automático y combinaciones de los mismos. En determinados casos, el algoritmo estadístico comprende un único sistema clasificador estadístico de aprendizaje. En determinados otros casos, el algoritmo estadístico comprende una combinación de por lo menos dos clasificadores estadísticos de aprendizaje. En algunos casos, los dos o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje se aplican en tándem. Se describen ejemplos no limitativos de algoritmos estadísticos y análisis adecuados para la utilización en el método en la solicitud internacional n° PCT/US2011/056777, presentada el 18 de octubre de 2011.

30 El método puede comprender además enviar los resultados de la selección o determinación de la etapa (c) a un médico clínico. La etapa (c) puede comprender la selección de un curso de terapia inicial para el sujeto.

35 La etapa (b) puede comprender además aplicar un algoritmo estadístico a la presencia, nivel o genotipo de uno o más marcadores determinados en un tiempo anterior durante el curso de la terapia para generar un índice anterior de actividad/gravedad de la enfermedad. En algunos casos, el índice anterior de actividad/gravedad de la enfermedad se compara con el índice de actividad/gravedad de la enfermedad generado en la etapa (b) para determinar una dosis posterior del curso de la terapia o si debería administrarse un curso de terapia diferente. La dosis posterior del curso de terapia puede incrementarse, reducirse o mantenerse basándose en el índice de actividad/gravedad de la enfermedad generado en la etapa (b). En algunos casos, el curso diferente de terapia comprende un anticuerpo anti-TNF- α diferente. En otros casos, el curso de terapia diferente comprende el curso actual de terapia conjuntamente con un agente inmunosupresor.

45 Los métodos para detectar anticuerpos anti-TNF- α y anticuerpos antifármaco (AAF) se describen en la presente memoria y en la solicitud publicada de patente PCT n° WO 2011/056590. En particular, la presencia o el nivel de anticuerpos antifármaco puede determinarse según métodos que comprenden una etapa de disociación ácida mediante la puesta en contacto de una muestra con un ácido antes, durante y/o después de poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado.

50 Se da a conocer además un método para predecir el curso de una enfermedad o trastorno mediado por TNF- α en un sujeto, comprendiendo el método:

- (a) analizar una muestra obtenida del sujeto para determinar la presencia, el nivel o el genotipo de uno o más marcadores en la muestra,
- (b) aplicar un algoritmo estadístico a la presencia, nivel o genotipo de uno o más marcadores determinados en la etapa (a) para generar una actividad de enfermedad/índice de gravedad, y
- 55 (c) predecir el curso de la enfermedad o trastorno mediado por TNF- α basándose en el índice de actividad/gravedad de la enfermedad generado en la etapa (b).

60 La etapa (b) puede comprender además aplicar un algoritmo estadístico a la presencia, nivel o genotipo de uno o más marcadores determinados en un tiempo anterior para generar un índice anterior de actividad/gravedad de la enfermedad. En determinados casos, el índice anterior de actividad/gravedad de la enfermedad se compara con el índice de actividad/gravedad de la enfermedad generado en la etapa (b) para predecir el curso de la enfermedad o trastorno mediado por TNF- α .

Tras determinar el diagnóstico o pronóstico de un sujeto que recibe una terapia de fármaco anti-TNF- α o tras predecir la probabilidad de respuesta a un fármaco anti-TNF- α en un sujeto diagnosticado con una enfermedad o trastorno en el que se ha implicado TNF- α en la fisiopatología, por ejemplo, aunque sin limitación, choque, sepsis, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, ARN, enfermedad de Crohn, rechazo del trasplante y enfermedad del injerto contra el huésped, según los métodos descritos en la presente memoria, el presente método puede comprender además la recomendación de un curso de terapia basado en el diagnóstico, pronóstico o predicción. Se da a conocer que el método puede comprender además la administración en el sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco anti-TNF- α que resulta útil para tratar uno o más síntomas asociados a la enfermedad o trastorno mediado por TNF- α . Para aplicaciones terapéuticas, el fármaco anti-TNF- α puede administrarse solo o coadministrarse en combinación con uno o más fármacos anti-TNF- α adicionales y/o uno o más fármacos que reducen los efectos secundarios asociados al fármaco anti-TNF- α (por ejemplo un agente inmunosupresor). De esta manera, el presente método permite ventajosamente que un médico clínico ponga en práctica una "medicina personalizada" mediante el guiado de las decisiones de tratamiento e informando de la selección y optimización de la terapia de fármacos anti-TNF- α de manera que se administre el fármaco correcto al paciente correcto en el momento correcto.

IV. Índice de actividad/gravedad de la enfermedad

En determinados aspectos, el presente método proporciona un análisis basado en un algoritmo de uno o de una pluralidad (por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más) marcadores biológicos para mejorar la exactitud de la selección de terapia, la optimización de la terapia, la reducción de la toxicidad y/o el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico de fármaco anti-TNF- α .

A título de ejemplo no limitativo, el índice de actividad/gravedad de la enfermedad puede comprender detectar, medir o determinar la presencia, nivel (concentración (por ejemplo total) y/o activación (por ejemplo fosforilación)) o genotipo de uno o más marcadores biológicos específicos en una o más de las categorías de marcadores biológicos siguientes:

- (1) Marcadores inflamatorios
- (2) Factores de crecimiento
- (3) Serología (por ejemplo marcadores inmunológicos)
- (4) Citoquinas y quimioquinas
- (5) Marcadores de estrés oxidativo
- (6) Receptores de superficie celular (por ejemplo CD64 y otros)
- (7) Rutas de señalización
- (8) Otros marcadores (por ejemplo marcadores genéticos, tales como los genes de la ruta inflamatoria).

La presencia y/o nivel de uno o los dos marcadores siguientes también puede detectarse, medirse o determinarse en una muestra del paciente (por ejemplo una muestra de suero de un paciente sometido a terapia de fármaco anti-TNF- α): (9) niveles de fármaco anti-TNF- α (por ejemplo niveles de anticuerpo terapéutico anti-TNF- α libre) y/o (10) niveles de anticuerpo antifármaco (AAF) (por ejemplo niveles de autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α).

A continuación puede aplicarse un único algoritmo estadístico o una combinación de dos o más algoritmos estadísticos en la presente memoria a la presencia, nivel de concentración, nivel de activación o genotipo de los marcadores detectados, medidos o determinados en la muestra, para de esta manera seleccionar la terapia, optimizar la terapia, reducir la toxicidad o realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α . De esta manera, los métodos resultan útiles en la determinación del control del paciente mediante la determinación del estado inmunológico del paciente.

La comprensión del curso clínico de la enfermedad permitirá a los médicos realizar decisiones de tratamiento mejor informadas para sus pacientes de enfermedad inflamatoria (por ejemplo EII (por ejemplo enfermedad de Crohn), artritis reumatoide (AR), otras) y podría ayudar a dirigir el desarrollo de nuevos fármacos en el futuro. El marcador o marcadores biológicos ideales para la utilización en el índice de actividad/gravedad de la enfermedad descrito en la presente memoria debería poder identificar los individuos en riesgo de la enfermedad y debería ser específico de la misma. Además, el marcador o marcadores biológicos debería poder detectar la actividad de la enfermedad y permitir un seguimiento del efecto del tratamiento y debería presentar un valor predictivo de la recaída o recurrencia de la enfermedad. Sin embargo, la predicción del curso de la enfermedad ahora se ha expandido más allá de simplemente la recurrencia de la enfermedad, quizás más importante, se ha expandido para incluir predictores de complicaciones de la enfermedad, incluyendo la cirugía. El presente método resulta particularmente ventajoso porque proporciona indicadores de la actividad y/o gravedad de la enfermedad y porque permite obtener una predicción del riesgo de recaída en aquellos pacientes en remisión. Además, los marcadores biológicos e índice de actividad/gravedad de la enfermedad del presente método presentan enormes implicaciones para el control del paciente, así como para la toma de decisiones terapéuticas y ayudaría o asistiría en dirigir la terapia apropiada a

aquellos pacientes que es más probable que se beneficiasen de la misma y evitaría el coste y potencial toxicidad de la terapia de mantenimiento crónica en pacientes con bajo riesgo de recurrencia.

A. Marcadores inflamatorios

5 Aunque el curso de una enfermedad inflamatoria típicamente se mide en términos de actividad inflamatoria mediante ensayos no invasivos, utilizando el recuento de glóbulos blancos, este método presenta una baja especificidad y muestra una correlación limitada con la actividad de la enfermedad.

10 De esta manera, varios marcadores inflamatorios, incluyendo marcadores bioquímicos, marcadores serológicos, marcadores proteicos, marcadores genéticos y otras características clínicas o ecográficas, resultan particularmente útiles en los métodos para seleccionar la terapia, para optimizar la terapia, para reducir la toxicidad y/o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con uno o más agentes terapéuticos tales como fármacos biológicos (por ejemplo los fármacos anti-TNF- α). En determinados aspectos, los métodos descritos en la presente memoria utilizan la aplicación de un algoritmo (por ejemplo el análisis estadístico) a la presencia, nivel de concentración y/o genotipo determinado para uno o más marcadores inflamatorios (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF- α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF- α , para reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF- α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α .

25 Entre los ejemplos no limitativos de marcadores inflamatorios adecuados para la utilización en el presente método se incluyen marcadores bioquímicos, serológicos y marcadores proteicos, tales como, por ejemplo, citoquinas, quimoquinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adhesión celular, proteínas S100 y/o otros marcadores inflamatorios.

1. Citoquinas y quimoquinas

30 La determinación de la presencia o del nivel de por lo menos una citoquina o quimoquina en una muestra resulta particularmente útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "citoquina" incluye cualquiera de entre una diversidad de polipéptidos o proteínas secretados por células inmunológicas que regulan un abanico de funciones del sistema inmunológico y comprende citoquinas pequeñas tales como las quimoquinas. El término "citoquina" incluye además las adipocitoquinas, que comprenden un grupo de citoquinas secretadas por adipocitos que funcionan, por ejemplo, en la regulación del peso corporal, la hematopoyesis, la angiogénesis, la cicatrización de heridas, la resistencia a la insulina, la respuesta inmunológica y la respuesta inflamatoria.

40 En determinados aspectos, se determina en una muestra la presencia o el nivel de por lo menos una citoquina, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, TNF α , inductor débil de apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), osteoprotegerina (OPG), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, receptor soluble de IL-6 (sIL-6R), IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-27. En determinados otros aspectos, se determina en una muestra la presencia o el nivel de por lo menos una quimoquina, tal como, por ejemplo, CXCL1/GRO1/GROa, CXCL2/GRO2, CXCL3/GRO3, CXCL4/PF-4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15, CXCL16, CXCL17/DMC, CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/CCL10, CCL11/eotaxina, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/MIP-5, CCL16/LEC, CCL17/TARC, CCL18/MIP-4, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF1, CCL24/Eotaxin-2, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxin-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CL1, CL2 y CX₃CL1. En determinados aspectos adicionales, se determina en una muestra la presencia o el nivel de por lo menos una adipocitoquina, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, la leptina, la adiponectina, la resistina, el inhibidor 1 del activador del plasminógeno activo o total (PAI-1), visfatina y proteína 4 de unión a retinol (PUR4). Preferentemente, se determina la presencia o el nivel de TNF α , IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-13, IL-15, IFN (e.g., IFN- α , IFN- β , IFN- γ), IL-10, CCL5/RANTES y/o otras citoquinas o quimoquinas.

55 En determinados casos, la presencia o el nivel de una citoquina o quimoquina particular se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de una citoquina o quimoquina particular se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de una citoquina o quimoquina de interés en una muestra de suero, plasma, saliva u orina se encuentran disponibles de, por ejemplo, R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), Neogen Corp. (Lexington, KY), Alpco Diagnostics (Salem, NH), Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI), BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA), Invitrogen (Camarillo, CA), Calbiochem (San Diego, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY),

QIAGEN Inc. (Valencia, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y/o Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA).

5 La secuencia del polipéptido IL-6 humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_000591. La secuencia (codificante) del ARNm de IL-6 humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_000600. El experto en la materia apreciará que IL-6 también es conocido como interferón beta 2 (IFNB2), HGF, HSF y BSF2.

10 La secuencia del polipéptido IL-1 β humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_000567. La secuencia (codificante) del ARNm de IL-1 β humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_000576. El experto en la materia apreciará que IL-1 β también es conocido como IL1 F2 e IL-1beta.

15 La secuencia del polipéptido IL-8 humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_000575 (SEC ID nº 1). La secuencia (codificante) del ARNm de IL-8 humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_000584 (SEC ID nº 2). El experto en la materia apreciará que IL-8 también es conocido como CXCL8, K60, NAF, GCP1, LECT, LUCT, NAP1, 3-10C, GCP-1, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAP-1, SCYB8, TSG-1, AMCF-I y b-ENAP.

20 La secuencia del polipéptido TWEAK humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_003800 y AAC51923. La secuencia (codificante) del ARNm de TWEAK humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_003809 y BC104420. El experto en la materia apreciará que TWEAK también es conocido como el elemento 12 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNFSF12), ligando APO3 (APO3L), CD255, ligando de DR3, ligando 14 inducible por factor de crecimiento (Fn14) y UNQ181/PR0207.

25 2. Proteínas de fase aguda

La determinación de la presencia o del nivel de por lo menos una o más proteínas de fase aguda en una muestra también resulta útil en el presente método. Las proteínas de fase aguda son una clase de proteínas cuyas concentraciones plasmáticas se incrementan (proteínas de fase aguda positivas) o se reducen (proteínas de fase aguda negativas) en respuesta a la inflamación. Esta respuesta se denomina reacción de fase aguda (también denominada respuesta de fase aguda). Entre los ejemplos de proteínas de fase aguda positivas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la proteína C reactiva (PRC), la proteína dímero D, la proteína de unión a manosa, alfa-1 antitripsina, alfa1-antiquimotripsina, alfa2-macroglobulina, fibrinógeno, protrombina, factor VIII, factor de von Willebrand, plasminógeno, factores del complemento, ferritina, componente P del amiloide sérico, amiloide sérico A (ASA), orosomucoide (glucoproteína ácida alfa 1, GPA), ceruloplasmina, haptoglobina y combinaciones de los mismos. Entre los ejemplos no limitativos de proteínas de fase aguda negativas se incluyen albumina, transferrina, transtiretina, transcortina, proteína de unión a retinol y combinaciones de las mismas. Preferentemente se determina la presencia o el nivel de PRC y/o ASA.

40 En determinados casos, la presencia o el nivel de una citoquina o quimoquina particular se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de una proteína de fase aguda particular se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo ELISA colorimétrico de tipo sándwich disponible de Alpc Diagnostics (Salem, NH) para determinar el nivel de PRC en una muestra de suero, plasma, orina o heces. De manera similar, puede utilizarse un kit de ELISA disponible de Biomeda Corporation (Foster City, CA) para detectar los niveles de PRC en una muestra. Otros métodos para determinar los niveles de PRC en una muestra se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 6.838.250 y nº 6.406.862, y las publicaciones de patente US nº 2006/0024682 y nº 2006/0019410. Entre los métodos adicionales para determinar los niveles de PRC se incluyen, por ejemplo, los ensayos de inmunoturbidimetría, los ensayos de inmunodifusión rápida y los ensayos de aglutinación visuales. Los kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de AAS en una muestra, tal como suero, plasma, saliva, orina o heces, se encuentran disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Abazyme (Needham, MA), USCN Life (Missouri City, TX) y/o U.S. Biological (Swampscott, MA).

55 La proteína C reactiva (PRC) es una proteína presente en la sangre en respuesta a la inflamación (una proteína de fase aguda). PRC es típicamente producida por el hígado y por las células grasas (adipocitos). Es un elemento de la familia de proteínas de la pentraxina. La secuencia del polipéptido PRC humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_000558. La secuencia (codificante) del ARNm de la PRC humana se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_000567. El experto en la materia apreciará que la PRC también es conocida como PTX1, MGC88244 y MGC149895.

Las proteínas del amiloide A sérico (AAS) Se expresan constitutivamente diferentes isoformas de AAS (ASS constitutivas) a niveles diferentes o en respuesta a estímulos inflamatorios (AAS de fase aguda). Estas proteínas son producidas predominantemente por el hígado. La conservación de estas proteínas en todos los invertebrados y vertebrados sugiere que las AAS desempeñan una función absolutamente esencial en todos los animales. Las proteínas de amiloide A sérico de fase aguda (AAS-A) son secretadas durante la fase aguda de la inflamación. La secuencia del polipéptido AAS humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_000322. La secuencia (codificante) del ARNm de la AAS humana se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_000331. El experto en la materia apreciará que la AAS también es conocida como PIG4, TP5314, MGC111216 y SAA1.

3. Moléculas de adhesión celular (MAC IgSF)

La determinación de la presencia o del nivel de por lo menos una o más moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas en una muestra también resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas" (MAC IgSF) incluye cualquiera de entre una diversidad de polipéptidos o proteínas situadas sobre la superficie de una célula que presenta uno o más dominios plegados de tipo inmunoglobulina, y que funcionan en la adhesión intercelular y/o en la transducción de señales. En muchos casos, las MAC IgSF son proteínas transmembranales. Entre los ejemplos no limitativos de MAC IgSF se incluyen las moléculas de adhesión a células neuronales (MACN, por ejemplo MACN-120, MACN-125, MACN-140, MACN-145, MACN-180, MACN-185, etc.), moléculas de adhesión intercelular (MAIC, por ejemplo MAIC-1, MAIC-2, MAIC-3, MAIC-4 y MAIC-5), molécula 1 de adhesión celular vascular (MACV-1), molécula 1 de adhesión a células endoteliales-plaquetas (MAPCE-1), molécula de adhesión celular L1 (MACL1), molécula de adhesión celular con homología con MACL1 (homólogo próximo de L1) (HPL1), lectinas de tipo Ig de unión a ácido siálico (LIUAS, por ejemplo LIUAS-1, LIUAS-2, LIUAS-3, LIUAS-4, etc.), nectinas (por ejemplo nectina-1, nectina-2, nectina-3, etc.) y moléculas de tipo nectina (por ejemplo Necl-1, Necl-2, Necl-3, Necl-4 y Necl-5). Preferentemente se determina la presencia o el nivel de MAIC-1 y/o MACV-1.

MAIC-1 es una proteína de adhesión celular transmembranal que se encuentra continuamente presente a bajas concentraciones en las membranas de los leucocitos y las células endoteliales. Con la estimulación de las citoquinas, las concentraciones se incrementan mucho. La MAIC1 puede ser inducida por IL-1 y TNF- α y es expresada por el endotelio vascular, los macrófagos y los linfocitos. En la EII, las citoquinas proinflamatorias causan la inflamación mediante la regulación positiva de la expresión de las moléculas de adhesión, tales como MAIC1 y MACV-1. La expresión incrementada de las moléculas de adhesión recluta más linfocitos al tejido infectado, resultando en la inflamación del tejido (ver Goke *et al.*, J. Gastroenterol. 32:480, 1997, y Rijcken *et al.*, Gut. 51:529, 2002). MAIC1 está codificada por el gen de la molécula 1 de adhesión intercelular (MAIC1, Entrez ID génico 3383, GenBank nº de acceso NM_000201) y es producida tras el procesamiento del polipéptido precursor de la molécula 1 de adhesión intercelular (GenBank nº de acceso SNP_000192).

MACV-1 es una proteína de adhesión celular transmembrana que media en la adhesión de los linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos al endotelio vascular. La regulación positiva de MACV-1 en las células endoteliales por las citoquinas se produce como resultado de una transcripción génica incrementada (Por ejemplo en respuesta al factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleuquina-1 (IL-1)). La MACV-1 está codificada por el gen de la molécula 1 de adhesión celular vascular (MACV-1, Entrez ID génico 7412) y es producida tras el procesamiento diferencial del transcrito (GenBank nº de acceso NM_001078 (variante 1) o NM_080682 (variante 2)) y el procesamiento de la isoforma de procesamiento del polipéptido precursor (GenBank nº de acceso NP_001069 (isoforma a) o NP_542413 (isoforma b)).

En determinados casos, la presencia o el nivel de una MAC IgSF se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de una MAC IgSF se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los anticuerpos y/o kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de MAIC-1 y/o MACV-1 en una muestra, tal como una muestra de tejido, biopsia, suero, plasma, saliva, orina o heces se encuentran disponibles de, por ejemplo, Invitrogen (Camarillo, CA), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) y/o Abcam Inc. (Cambridge, MA).

4. Proteínas S100

La determinación de la presencia o del nivel de por lo menos una proteína S100 en una muestra también resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína S100" incluye cualquier elemento de una familia de proteínas ácidas de baja masa molecular caracterizadas por la expresión específica de tipo celular y la presencia de 2 dominios de unión a calcio EF-hand. Existen por lo menos 21 tipos diferentes de proteínas S100 en el ser humano. El nombre se deriva del hecho de que las proteínas S100 son 100% solubles en sulfato amónico a pH neutro. La mayoría de proteínas S100 son homodiméricas, consistiendo de dos polipéptidos

idénticos que se mantienen unidos mediante enlaces no covalentes. Aunque las proteínas S100 son estructuralmente similares a la calmodulina, difieren en que son específicas de tipo celular, se expresan en células particulares a diferentes niveles dependiendo de factores ambientales. Las proteínas S-100 se encuentran normalmente presentes en células derivadas de la cresta neural (por ejemplo células de Schwann, melanocitos, células gliales), condrocitos, adipocitos, células mioepiteliales, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas y queratinocitos. Las proteínas S100 se han implicado en una diversidad de funciones intracelulares y extracelulares, tales como la regulación de la fosforilación de proteínas, los factores de transcripción, la homeostasis de Ca^{2+} , la dinámica de constituyentes del citoesqueleto, las actividades enzimáticas, el crecimiento y la diferenciación celulares y la respuesta inflamatoria.

La calgranulina es una proteína S100 que se expresa en múltiples tipos celulares, incluyendo las células epiteliales renales y los neutrófilos, y es abundante en monocitos infiltrantes y granulocitos bajo condiciones de inflamación crónica. Entre los ejemplos de calgranulinas se incluyen, aunque sin limitación, la calgranulina A (también conocida como S100A8 ó MRP-8), la calgranulina B (también conocida como S100A9 ó MRP-14) y la calgranulina C (también conocida como S100A12).

En determinados casos, la presencia o el nivel de una proteína S100 particular se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de una proteína S100 particular se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Se encuentran disponibles kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de una proteína S100, tal como calgranulina A (S100A8), calgranulina B (S100A9) o calgranulina C (S100A12) en una muestra de suero, plasma o suero, por ejemplo de Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA) y Hycult Biotechnology b.v. (Uden, Países Bajos).

La calprotectina, el complejo de S100A8 y S100A9, es una proteína de unión a calcio y a cinc presente en el citosol de neutrófilos, monocitos y queratinocitos. La calprotectina es una proteína importante en los granulocitos y macrófagos neutrófilos y constituye hasta 60% de las proteínas totales en el fracción citosol en estas células. Por lo tanto, es un marcador sustitutivo de la producción de neutrófilos. Su concentración en las heces se correlaciona con la intensidad de la infiltración de los neutrófilos en la mucosa intestinal y con la gravedad de la inflamación. En algunos casos la calprotectina se mide con un ELISA utilizando muestras fecales pequeñas (50 a 100 mg) (ver, por ejemplo, Johnne *et al.*, Scand. J. Gastroenterol. 36:291-296, 2001).

5. Otros marcadores inflamatorios

La determinación de la presencia o del nivel de la lactoferrina en una muestra también resulta útil en el presente método. En determinados casos, la presencia o el nivel de lactoferrina se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de lactoferrina se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Puede utilizarse un kit de ELISA de lactoferrina disponible de Calbiochem (San Diego, CA) para detectar la lactoferrina humana en una muestra de plasma, orina, lavado broncoalveolar o líquido cerebroespinal. De manera similar, puede utilizarse un kit de ELISA disponible de U.S. Biological (Swampscott, MA) para determinar el nivel de lactoferrina en una muestra de plasma. La publicación de patente US nº 2004/0137536 describe un ensayo de ELISA para determinar la presencia de niveles elevados de lactoferrina en una muestra de heces. De manera similar, la publicación de patente US nº 2004/0033537 describe un ensayo ELISA para determinar la concentración de lactoferrina endógena en una muestra de heces, moco o bilis. La presencia o el nivel de anticuerpos antilactoferrina puede detectarse en una muestra utilizando, por ejemplo, proteína lactoferrina o un fragmento de la misma.

La determinación de la presencia o el nivel de una o más isozimas de piruvato quinasa, tales como M1-PK y M2-PK en una muestra también resulta útil. En determinados casos, la presencia o el nivel de M1-PK y/o M2-PK se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de M1-PK y/o M2-PK se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. También se conocen los isozimas M1/M2 de piruvato quinasa como isozima muscular de piruvato quinasa (PKM), la piruvato quinasa de tipo K, la proteína de unión a la hormona tiroidea citosólica (PUHTC), la proteína 1 de unión a la hormona tiroidea (PUHT1) o la proteína 3 de interacción con opa (PIO3).

La determinación de la presencia o del nivel de uno o más factores de crecimiento en una muestra también resulta útil en el presente método. Entre los ejemplos no limitativos de factores de crecimiento se incluyen los factores de crecimiento transformante (FCT), tales como FCT- α , FCT- β , FCT- β 2, FCT- β 3, etc., que se describen en detalle posteriormente.

6. Conjunto ejemplar de marcadores inflamatorios

Puede detectarse por lo menos uno o una pluralidad (por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más, tales como, por ejemplo, un panel) de los marcadores inflamatorios siguientes (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad y/o para mejorar la exactitud de la selección de terapia, la optimización de la terapia, la reducción de la toxicidad y/o el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico de la terapia de fármato anti-TNF- α :

- a. PRC
- b. AAS
- c. MACV
- d. MAIC
- e. calprotectina
- f. lactoferrina
- g. IL8
- h. Rantes
- i. TNF- α
- j. IL-6k
- k. IL-1 beta
- l. S100A12
- m. piruvato quinasa (PK) M2
- n. IFN
- o. IL2
- p. FCT
- q. IL-13
- r. IL-15
- s. IL12
- t. Otras quimoquinas o citoquinas.

B. Factores de crecimiento

Una diversidad de factores de crecimiento, incluyendo marcadores bioquímicos, marcadores serológicos, marcadores proteicos, marcadores genéticos y otras características clínicas o ecográficas, resultan particularmente adecuados para la utilización en los métodos para seleccionar la terapia, para optimizar la terapia, para reducir la toxicidad y/o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con uno o más agentes terapéuticos tales como fármacos biológicos (por ejemplo los fármacos anti-TNF- α). En determinados aspectos, los métodos descritos en la presente memoria utilizan la aplicación de un algoritmo (por ejemplo el análisis estadístico) a la presencia, nivel de concentración y/o genotipo determinado para uno o más marcadores inflamatorios (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF- α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF- α , para reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF- α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α .

De esta manera, la determinación de la presencia o del nivel de uno o más factores de crecimiento en una muestra también resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "factor de crecimiento" incluye cualquiera de entre una diversidad de péptidos, polipéptidos o proteínas que son capaces de estimular la proliferación celular y/o la diferenciación celular.

En determinados aspectos, se determina en una muestra la presencia o el nivel de por lo menos un factor de crecimiento, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el factor de crecimiento epidérmico (FCE), el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (FCE-UH), el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), el factor derivado de epitelio pigmentado (FDEP, también conocido como SERPINF1), la anfirregulina (AREG, también conocida como factor de crecimiento derivado de schwannoma (FCDS)), factor de crecimiento fibroblástico básico (FCFb), factor de crecimiento de hepatocitos (FCH), factor α de crecimiento transformante (FCT- α), factor β de crecimiento transformante (FCT- β 1, FCT- β 2, FCT- β 3, etc.), endotelina-1 (ET-1), factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ, también conocido como FGF7), proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo PMO1-PMO15), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento nervioso (FCN), factor de crecimiento nervioso β (FCN- β), factores neurotróficos (por ejemplo factor neurotrófico derivado de cerebro (FNDC), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4), etc.), factor 9 de diferenciación del crecimiento (FDC-9), factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FEC-GM), miostatina (GDF-8), eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina (TPO). En particular, puede determinarse la presencia o el nivel de por lo menos uno de entre FCEV, FCE, FCFb, ET-1, FCT- β 2 y/o FCT- β 3. Se ha encontrado que estos marcadores son significativamente más abundantes en EII activa que en los controles, indicando que podrían desempeñar un papel en la inducción de la cicatrización tras los daños mucosales en la superficie luminal del intestino en la EII.

En determinados casos, la presencia o el nivel de un factor de crecimiento particular se detecta al nivel de la expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. En determinados otros casos, la presencia o el nivel de un factor de crecimiento particular se detecta al nivel de la expresión de proteínas utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Se encuentran disponibles kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de un factor de crecimiento en una muestra de suero, plasma, saliva u orina de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Promega (Madison, WI), R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), Invitrogen (Camarillo, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Neogen Corp. (Lexington, KY), PreproTech (Rocky Hill, NJ), Alpco Diagnostics (Salem, NH), Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL) y/o Abazyme (Needham, MA).

La secuencia polipeptídica del factor de crecimiento epidérmico (FCE) humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_001954 (SEC ID nº 19). La secuencia (codificante) del ARNm del FCE humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_001963 (SEC ID nº 20). El experto en la materia apreciará que el FCE también se conoce como beta-urogastrona, URG y HOMG4.

La secuencia del polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NP_001020537 (SEC ID nº 21), NP_001020538, NP_001020539, NP_001020540, NP_001020541, NP_001028928, y NP_003367. La secuencia (codificante) del ARNm del FCEV humano se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_001025366 (SEC ID nº 22), NM_001025367, NM_001025368, NM_001025369, NM_001025370, NM_001033756, and NM_003376. El experto en la materia apreciará que el FCEV también se conoce como VPF, VEGFA, VEGFA y MGC70609

Puede detectarse por lo menos uno o una pluralidad (por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más, tal como, por ejemplo, un panel) de los marcadores inflamatorios siguientes (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad y/o para mejorar la exactitud de la selección de terapia, la optimización de la terapia, la reducción de la toxicidad y/o el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico de la terapia de fármaco anti-TNF- α : FEC-GM, FCEV, FCE, factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ, FCF7) y otros factores de crecimiento.

C. Serología (marcadores inmunológicos)

La determinación de marcadores serológicos o inmunológicos, tales como autoanticuerpos, en una muestra (por ejemplo una muestra de suero) también resulta útil en el presente método. Los anticuerpos contra moléculas antiinflamatorias tales como IL-10, FCT- β y otros pueden suprimir la capacidad del cuerpo de controlar la inflamación y la presencia o el nivel de estos anticuerpos en el paciente indica que deben utilizarse potentes medicamentos inmunosupresores, tales como los fármacos anti-TNF- α . La cicatrización mucosal puede resultar en una reducción del título de anticuerpos contra antígenos bacterianos tales como, por ejemplo, OmpC, flagelinas (cBir-1, Fla-A, FlaX, etc.), I2 y otros (pANCA, ASCA, etc.).

De esta manera, en determinados aspectos, los métodos descritos en la presente memoria utilizan la aplicación de un algoritmo (por ejemplo el análisis estadístico) a la presencia, nivel de concentración y/o genotipo determinado para uno o más marcadores inflamatorios (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF- α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF- α , para reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF- α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α .

Entre los ejemplos no limitativos de marcadores inmunológicos serológicos adecuados para la utilización en el presente método se incluyen anticuerpos antineutrófilos, anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* y/o otros anticuerpos antimicrobianos.

1. Anticuerpos antineutrófilos

La determinación de los niveles de ANAC y/o la presencia o la ausencia de pANAC en una muestra resulta útil en los métodos. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo citoplasmático antineutrófilos" o "ACAN" incluye anticuerpos dirigidos contra componentes citoplasmáticos y/o nucleares de los neutrófilos. La actividad de ACAN puede dividirse en varias categorías amplias basándose en el patrón de tinción de ACAN en los neutrófilos: (1) tinción de neutrófilos citoplasmáticos sin marcado perinuclear (ANACc), (2) tinción perinuclear en torno al borde exterior del núcleo (pANAC), (3) tinción perinuclear en torno al borde interior del núcleo (NSNA), y (4) tinción difusa con manchas en todo el neutrófilo (SAPPA). En determinados casos, la tinción pANAC es sensible al tratamiento de ADNasa. El término ANAC comprende todas las variedades de reactividad antineutrófilos, incluyendo,

aunque sin limitación, ANACc, ANACp, NSNA y SAPPa. De manera similar, el término ANAC comprende todos los isotipos de inmunoglobulina, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, las inmunoglobulinas A y G.

Los niveles de ANAC en una muestra de un individuo pueden determinarse utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo tal como un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) con neutrófilos fijados con alcohol. La presencia o la ausencia de una categoría particular de ANAC, tal como pANAC, puede determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo inmunohistoquímico tal como un ensayo de anticuerpos fluorescentes indirectos (AFI). Preferentemente, la presencia o la ausencia de pANAC en una muestra se determina utilizando un ensayo de inmunofluorescencia con neutrófilos fijados y tratados con ADNasa. Además de neutrófilos fijados, entre los antígenos específicos para ANAC que resultan adecuados para determinar los niveles de ANAC se incluyen, aunque sin limitación, extractos de neutrófilos no purificados o parcialmente purificados, proteínas purificadas, fragmentos de proteínas o péptidos sintéticos, tales como histona H1 ó fragmentos reactivos con ANAC de los mismos (ver, por ejemplo, patente US nº 6.074.835), antígenos de tipo histona H1, antígenos porina, antígenos de *Bacteroides* o fragmentos reactivos con ANAC de los mismos (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.033.864), antígenos de vesículas secretorias o fragmentos reactivos con ANAC de los mismos (ver, por ejemplo, solicitud de patente USA nº 08/804.106) y anticuerpos idiotípicos anti-ANAC. El experto en la materia apreciará que la utilización de antígenos adicionales específicos para ANAC resulta posible con el presente método.

2. Anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*

La determinación de los niveles de AASC (por ejemplo AASC-IgA y/o AASC-IgG) en una muestra resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "inmunoglobulina A anti-*Saccharomyces cerevisiae*" o "AASC-IgA" incluye anticuerpos del isotipo inmunoglobulina A que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*. De manera similar, la expresión "inmunoglobulina G anti-*Saccharomyces cerevisiae*" o "AASC-IgG" incluye anticuerpos del isotipo inmunoglobulina G que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*.

La determinación de si una muestra es positiva para AASC-IgA o AASC-IgG se lleva a cabo utilizando un antígeno específico para AASC. Dicho antígeno puede ser cualquier antígeno o mezcla de antígenos que se une específicamente a AASC-IgA y/o AASC-IgG. Aunque los anticuerpos AASC se caracterizaron inicialmente por su capacidad de unirse a *S. cerevisiae*, el experto en la materia entenderá que un antígeno que se une específicamente a AASC puede obtenerse a partir de *S. cerevisiae* o de una diversidad de otras fuentes con la condición de que el antígeno sea capaz de unirse específicamente a los anticuerpos AASC. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, entre las fuentes ejemplares de un antígeno específico para AASC que pueden utilizarse para determinar los niveles de AASC-IgA y/o AASC-IgG en una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células de levadura muertas enteras, tales como células de *Saccharomyces* o de *Candida*, manano de pared celular de levadura, tal como fosfopeptidomanano (PPM), oligosacáridos tales como oligomanósidos, neoglucolípidos, anticuerpos idiotípicos anti-AASC y similares. Resultan adecuadas diferentes especies y cepas de levadura, tales como *S. cerevisiae* cepas Su1, Su2, CBS 1315 ó BM 156, o *Candida albicans* cepa VW32, para la utilización como antígeno específico para AASC-IgA y/o AASC-IgG. También resultan adecuados antígenos purificados y sintéticos específicos para AASC en la determinación de los niveles de AASC-IgA y/o AASC-IgG en una muestra. Entre los ejemplos de antígenos purificados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, antígenos oligosacáridos purificados, tales como oligomanósidos. Entre los ejemplos de antígenos sintéticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, oligomanósidos sintéticos tales como los descritos en la publicación de patente US nº 2003/0105060, por ejemplo D-Man $\beta(1-2)$ D-Man $\beta(1-2)$ D-Man-OR, D-Man $\alpha(1-2)$ D-Man $\alpha(1-2)$ D-Man $\alpha(1-2)$ D-Man-OR y D-Man $\alpha(1-3)$ D-Man $\alpha(1-2)$ D-Man $\alpha(1-2)$ D-Man-OR, en donde R es un átomo de hidrógeno, un alquilo C₁ a C₂₀, o un grupo conector opcionalmente marcado.

Las preparaciones de mananos de pared celular de levadura, por ejemplo PPM, pueden utilizarse para determinar los niveles de AASC-IgA y/o AASC-IgG en una muestra. Dichos antígenos de superficie solubles en agua pueden prepararse mediante cualquier técnica de extracción apropiada conocida de la técnica, incluyendo, por ejemplo, el autoclavado, o pueden obtenerse comercialmente (ver, por ejemplo, Lindberg *et al.*, Gut 33:909-913, 1992). La fracción estable frente a ácidos de PPM también resulta útil en los algoritmos estadísticos (Sendid *et al.*, Clin. Diag. Lab. Immunol. 3:219-226, 1996). Un PPM ejemplar que resulta útil para determinar los niveles de AASC en una muestra se deriva de *S. uvarum* cepa ATCC nº 38926.

Los antígenos oligosacáridos purificados, tales como oligomanósidos, también pueden resultar útiles para determinar los niveles de AASC-IgA y/o AASC-IgG en una muestra. Los antígenos oligomanósido purificados preferentemente se convierten en neoglucolípidos tal como se describe en, por ejemplo, Faille *et al.*, Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 11:438-446, 1992. El experto en la materia entenderá que la reactividad de dicho antígeno oligomanósido con AASC puede optimizarse modificando la longitud de cadena del manosilo (Frosh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1194-1198, 1985), la configuración anomérica (Fukazawa *et al.*, en: "Immunology of Fungal Disease", E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, páginas 37-62, 1989; Nishikawa *et al.*, Microbiol. Immunol. 34:825-840, 1990; Poulain *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. 23:46-52, 1993; Shibata *et al.*, Arch. Biochem.

Biophys. 243:338-348, 1985 Trinel *et al.*, Infect. Immun., 60:3845-3851, 1992); o la posición del enlace (Kikuchi *et al.*, Planta 190:525-535, 1993).

5 Entre los oligomanósidos adecuados para la utilización en los métodos se incluyen, aunque sin limitación, un oligomanósido que presenta la manotetraosa Man(1-3) Man(1-2) Man(1-2) Man. Dicho oligomanósido puede purificarse a partir de PPM tal como se describe en, por ejemplo, Faille *et al.*, *supra*. Un neoglucolípido ejemplar específico para AASC puede construirse liberando el oligomanósido de su PPM respectivo y posteriormente acoplando el oligomanósido liberado con 4-hexadecil-anilina o similar.

10 3. Anticuerpos antimicrobianos

La determinación de los niveles de anticuerpo anti-OmpC en una muestra también resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo anti-proteína C de membrana externa" o "anticuerpo anti-OmpC" incluye anticuerpos dirigidos contra una porina de membrana externa bacteriana tal como se describe en, por ejemplo, la publicación de patente PCT nº WO 01/89361. La expresión "proteína C de membrana externa" o "OmpC" se refiere a una porina bacteriana que es inmunorreactiva con un anticuerpo anti-OmpC.

El nivel de anticuerpo anti-OmpC presente en una muestra de un individuo puede determinarse utilizando una proteína OmpC o un fragmento de la misma, tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Entre los antígenos OmpC adecuados que resultan útiles para determinar los niveles de anticuerpo anti-OmpC en una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, una proteína OmpC, un polipéptido OmpC que presenta sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína OmpC, o un fragmento de la misma, tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Tal como se utiliza en la presente memoria, un polipéptido OmpC generalmente describe los polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos con una identidad superior a aproximadamente 50%, preferentemente superior a aproximadamente 60%, más preferentemente superior a aproximadamente 70%, todavía más preferentemente superior a aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a una proteína OmpC, determinando la identidad de aminoácidos con un programa de alineación de secuencias tal como CLUSTALW. Dichos antígenos pueden prepararse mediante, por ejemplo, purificación a partir de bacterias entéricas, tales como *E. coli*, mediante expresión recombinante de un ácido nucleico, tal como GenBank nº de acceso K00541, por medios sintéticos, tal como la síntesis peptídica en solución o en fase sólida, o mediante la utilización de expresión fágica.

La determinación de los niveles de anticuerpo anti-I2 en una muestra también resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo anti-I2" incluye los anticuerpos dirigidos contra un antígeno microbiano que comparte homología con reguladores transcripcionales bacterianos, tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 6.309.643. El término "I2" se refiere a un antígeno microbiano que es inmunorreactivo con un anticuerpo anti-I2. La proteína I2 microbiana es un polipéptido de 100 aminoácidos que comparte cierta débil homología con la proteína 4 predicha de *C. pasteurianum*, Rv3557c de *Mycobacterium tuberculosis* y un regulador transcripcional de *Aquifex aeolicus*. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteica de la proteína I2 se describen en, por ejemplo, la patente US nº 6.309.643.

El nivel de anticuerpo anti-I2 presente en una muestra de un individuo puede determinarse utilizando una proteína I2 o un fragmento de la misma, tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Entre los antígenos I2 adecuados que resultan útiles para determinar los niveles de anticuerpo anti-I2 en una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, una proteína I2, un polipéptido I2 que presenta sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína I2, o un fragmento de la misma, tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Dichos polipéptidos I2 muestran una similitud de secuencia superior respecto a la proteína I2 que respecto a la proteína 4 de *C. pasteurianum* e incluyen variantes de isotipo y homólogos de los mismos. Tal como se utiliza en la presente memoria, un polipéptido I2 generalmente describe los polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos con una identidad superior a aproximadamente 50%, preferentemente superior a aproximadamente 60%, más preferentemente superior a aproximadamente 70%, todavía más preferentemente superior a aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a una proteína I2 natural, determinando la identidad de aminoácidos con un programa de alineación de secuencias tal como CLUSTALW. Dichos antígenos I2 pueden prepararse mediante, por ejemplo, purificación a partir de microbios, mediante expresión recombinante de un ácido nucleico codificante de un antígeno I2, por medios sintéticos, tal como la síntesis peptídica en solución o en fase sólida, o mediante la utilización de expresión fágica.

La determinación de los niveles de anticuerpo anti-flagelina en una muestra también resulta útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo anti-flagelina" incluye anticuerpos dirigidos contra un componente proteico de los flagelos bacterianos, tal como se describe en, por ejemplo, la solicitud publicada de patente PCT nº WO 03/053220 y la publicación de patente US nº 2004/0043931. El término "flagelina" se refiere a una proteína de flagelo bacteriano que es inmunorreactiva con un anticuerpo anti-flagelina.

Las flagelinas microbianas son proteínas presentes en el flagelo bacteriano que se disponen en un cilindro hueco formando el filamento.

5 El nivel de anticuerpo anti-flagelina presente en una muestra de un individuo puede determinarse utilizando una proteína flagelina o un fragmento de la misma, tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Entre los antígenos flagelina adecuados que resultan útiles para determinar los niveles de anticuerpo anti-flagelina en una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la flagelina Cbir-1, la flagelina X, la flagelina A, la flagelina B, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, un polipéptido flagelina que presenta sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína flagelina, o un fragmento de la misma, tal como un fragmento
10 inmunorreactivo de la misma. Tal como se utiliza en la presente memoria, un polipéptido flagelina generalmente describe los polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos con una identidad superior a aproximadamente 50%, preferentemente superior a aproximadamente 60%, más preferentemente superior a aproximadamente 70%, todavía más preferentemente superior a aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a una proteína flagelina natural, determinando la identidad de aminoácidos con un programa de alineación de secuencias tal como CLUSTALW. Dichos antígenos flagelina pueden prepararse mediante, por ejemplo, purificación a partir de una bacteria tal como *Helicobacter Bilis*, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter pylori*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, y una bacteria presente en el ciego, mediante expresión recombinante de un ácido nucleico codificante de un antígeno flagelina, por medios sintéticos, tales como la síntesis peptídica en solución o en fase sólida, o mediante la utilización de expresión fágica.

20 D. Marcadores de estrés oxidativo

La determinación de los marcadores de estrés oxidativo en una muestra también resulta útil en el presente método. Entre los ejemplos no limitativos de marcadores de estrés oxidativo se incluyen los basados en proteínas o en ADN, los cuales pueden detectarse midiendo la oxidación de las proteínas y la fragmentación del ADN, respectivamente. Entre otros ejemplos de marcadores de estrés oxidativo se incluyen compuestos orgánicos tales como el malondialdehído.

30 El estrés oxidativo representa un desequilibrio entre la producción y la manifestación de especies de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar fácilmente los intermediarios reactivos o de reparar el daño resultante. Las perturbaciones del estado redox normal de los tejidos puede causar efectos tóxicos mediante la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Algunas especies oxidativas reactivas incluso pueden actuar como mensajeros mediante un fenómeno denominado señalización redox.

35 Los derivados de metabolitos oxidativos reactivos (DMOR), las proporciones de glutatión oxidado a reducido (Eh GSH) y/o las proporciones de cisteína oxidada a reducida (Eh CySH) pueden utilizarse para cuantificar el estrés oxidativo. Ver, por ejemplo, Neuman *et al.*, Clin. Chem., 53:1652-1657, 2007. Las modificaciones oxidativas de residuos de cisteína altamente reactivos en proteínas tales como las tirosina fosfatasas y las proteínas relacionadas con la tioredoxina también pueden detectarse o medirse utilizando técnicas tales como, por ejemplo, la espectrometría de masas (EM). Ver, por ejemplo, Naito *et al.*, Anti-Aging Medicine 7(5):36-44, 2010. Entre otros marcadores de estrés oxidativo se incluyen acroleína unida a proteína, tal como se describe en, por ejemplo, Uchida *et al.*, PNAS 95(9):4882-4887, 1998, el ensayo de radicales libres de oxígeno (ERLO), que refleja los niveles de hidroperóxidos orgánicos, y el potencial redox del par glutatión reducido/disulfuro de glutatión, (Eh) GSH/GSSG. Ver, por ejemplo, Abramson, Atherosclerosis 178(1):115-21, 2005.

E. Receptores de superficie celular

50 La determinación de los marcadores de superficie celular en una muestra también resulta útil en el presente método. La semivida de fármacos anti-TNF- α tales como Remicade y Humira se encuentra significativamente reducida en pacientes con un nivel de inflamación elevado. CD64, el receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina (Ig) G1 e IgG3, se expresa predominantemente en fagocitos mononucleares. Las células polimorfonucleares (PMN) en reposo apenas expresan CD64, pero la expresión de este marcador está regulada positivamente por interferón y factor estimulante de colonias de granulocitos que actúan sobre precursores mieloides en la médula ósea. El entrecruzamiento de CD64 con complejos de IgG ejerce varias respuestas celulares, incluyendo la internalización de complejos inmunológicos mediante endocitosis, la fagocitosis de partículas opsonizadas, la desgranulación, la activación del estallido oxidativo y la liberación de citoquinas.

60 De esta manera, en determinados aspectos, los métodos descritos en la presente memoria utilizan la aplicación de un algoritmo (por ejemplo el análisis estadístico) a la presencia, nivel de concentración y/o genotipo determinado para uno o más receptores de superficie celular tales como CD64 (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF- α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF- α , para

reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF- α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α .

F. Rutas de señalización

5 La determinación de las rutas de señalización en una muestra también resulta útil en el presente método. La activación de las células polimorfonucleares (PMN), seguido de la infiltración en la mucosa intestinal (sinovio en el caso de la AR) y la migración a través del epitelio de criptas se consideran una característica clave de la EII. Se ha estimado mediante excreción fecal de leucocitos marcados con indio-111 que la migración de las células PMN de la
10 circulación a la sección enfermedad del intestino se encuentra incrementada en 10 veces o más en los pacientes de EII. De esta manera, en determinados aspectos, la medición de la activación de las células PMN de la sangre o la inflamación de los tejidos mediante la medición de rutas de señalización utilizando un ensayo tal como el inmunoensayo reactivo incrementado con enzimas colaborativo (CEER) es una manera ideal de entender la enfermedad inflamatoria. La tecnología CEER se describe en los documentos de patente siguientes: solicitudes
15 publicadas de patente PCT n° WO 2008/036802, WO 2009/012140, WO 2009/108637, WO 2010/132723, WO 2011/008990 y WO 2011/050069; y la solicitud de patente PCT n° PCT/US2011/066624.

De esta manera, en determinados aspectos, los métodos descritos en la presente memoria utilizan la aplicación de un algoritmo (por ejemplo el análisis estadístico) a la presencia, nivel de concentración y/o genotipo determinado
20 para uno o más moléculas de transducción de señales en una o más rutas de señalización (por ejemplo solas o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF- α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF- α , para reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF- α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α . Puede medirse el nivel total y/o el nivel de activación
25 (por ejemplo fosforilación) de una o más moléculas de transducción de señales en una o más rutas de señalización.

La expresión "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que llevan a cabo el procedimiento por el que una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una respuesta, implicando típicamente secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas en el interior de la célula. Entre
30 los ejemplos de moléculas de transducción de señales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, los receptores tirosina quinasa, tales como RFCE (por ejemplo, RFCE/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), RFCEV1/FLT1, RFCEV2/FLK1/KDR, RFCEV3/FLT4, FLT3/FLK2, PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor relacionado con receptor de insulina), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, c-MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, cadherina V, LTK (tirosina quinasa de leucocitos), ALK (quinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3 y RTK 106; formas truncadas de receptores tirosina quinasa, tales como receptores de HER2 con dominios extracelulares aminotermiales faltantes (por ejemplo, p95ErbB2 (p95m), p110, p95c, p95n, etc.), receptores de cMET truncados con dominios extracelulares aminotermiales faltantes y receptores de HER3 truncados con dominios extracelulares aminotermiales faltantes; dímeros de receptor tirosina
40 quinasa (por ejemplo, p95HER2/HER3; p95HER2/HER2; receptor de HER3 truncado con HER1, HER2, HER3 ó HER4; HER2/HER2; HER3/HER3; HER2/HER3; HER1/HER2; HER1/HER3; HER2/HER4; HER3/HER4; etc.); no receptor tirosina quinasa, tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK; componentes de la cascada de señalización de la tirosina quinasa, tales como AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, variante de procesamiento alfa I de la quinasa S6 de p70), proteína tirosina fosfatasas (por ejemplo, PTP1B, 5 PTPN13, BDP1, etc.), RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc (p66), Ras (por ejemplo, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, GSK-3 β , RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67, paxilina, NF- κ B e IKK; receptores de hormona nuclear, tales como el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP), el receptor de andrógeno, el receptor de glucocorticoide, el receptor de mineralocorticoide, el receptor de vitamina A, el receptor de vitamina D, el receptor de retinoide, el receptor de hormona tiroidea y los receptores huérfanos; coactivadores y represores de receptor nuclear, tal como se amplifica en el cáncer de mama-1 (AIB1) y en el correpresor 1 de receptor nuclear (CORN), respectivamente, y combinaciones de los mismos.
55

La expresión "estado de activación" se refiere a si una molécula de transducción de señales particular se encuentra activada. De manera similar, la expresión "nivel de activación" se refiere a si una molécula de transducción de señales particular se encuentra activada. El estado de activación típicamente corresponde a la fosforilación, ubiquitinación y/o estado de acomplejamiento de una o más moléculas de transducción de señales. Entre los
60 ejemplos no limitativos de los estados de activación (listados entre paréntesis) se incluyen: HER1/EGFR (EGFRvIII, EGFR fosforilado (p-), EGFR:Shc, EGFR ubiquitinado (u-), p-EGFRvIII); ErbB2 (p-ErbB2, p95HER2 (ErbB2 truncado), pp95HER2, ErbB2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3 truncado, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-MET (p-c-MET, c-MET truncado,

- complejo c-Met:HGF); AKT1 (p-AKT1); AKT2 (p-AKT2); AKT3 (p-AKT3); PTEN (p-PTEN); P70S6K (p-P70S6K); MEK (p-MEK); ERK1 (p-ERK1); ERK2 (p-ERK2); PDK1 (p-PDK1); PDK2 (p-PDK2); SGK3 (p-SGK3); 4E-BP1 (p-4E-BP1); PIK3R1 (p-PIK3R1); c-KIT (p-c-KIT); ER (p-ER); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRA (p-PDGFR); PDGFRB (p-PDGFRB); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLCγ, VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCγ, VEGFR2:Src, VEGFR2:heparín-sulfato, VEGFR2:VE-cadherina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); TIE1 (p-TIE1); TIE2 (p-TIE2); EPHA (p-EPHA); EPHB (p-EPHB); GSK-3β (p-GSK-3β); NF-kB (p-NF-kB, NF-kB-IκB complejo alfa y otros), IκB (p-IκB, p-P65:IκB); IKK (fosfo IKK); BAD (p-BAD, BAD: 14-3-3); mTOR (p-mTOR); Rsk-1 (p-Rsk-1); Jnk (p-Jnk); P38 (p-P38); STAT1 (p-STAT1); STAT3 (p-STAT3); FAK (p-FAK); RB (p-RB); Ki67; p53 (p-p53); CREB (p-CREB); c-Jun (p-c-Jun); c-Src (p-c-Src); paxilina (p-paxilina); GRB2 (p-GRB2), Shc (p-Shc), Ras (p-Ras), GAB1 (p-GAB1), SHP2 (p-SHP2), GRB2 (p-GRB2), CRKL (p-CRKL), PLCγ (p-PLCγ), PKC (e.g., p-PKCα, p-PKCβ, p-PKCδ), adducina (p-adducina), RB1 (p-RB1) y PYK2 (p-PYK2).
- Las tablas siguientes proporcionan ejemplos adicionales de moléculas de transducción de señales para las que pueden determinarse en una muestra los niveles totales y/o la activación (por ejemplo la fosforilación) en una muestra (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF-α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF-α, para reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF-α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF-α.

Tabla 1

Ensayos Total / Fosfo		Sitios Fosfo
VEGFR2 Total	VEGFR2 Fosfo	Y951, 1212
Erk Total	Erk Fosfo	T202/Y204
Akt Total	Akt Fosfo	T308, 5473
MEK Total	MEK Fosfo	S217/221
MEK Total	MEK Fosfo	S217/221
P70S6K Total	P70S6K Fosfo	T389 (T229)
PTEN Total		
VEGFR1 (T)	VEGFR1 Fosfo	
SGK total	SGK Fosfo	T320, 5486
CRKL Total	CRKL Fosfo	Y207
SRCTotal	SRC Fosfo	Y 416, 527
FAK Total	FAK Fosfo	Y397
BCR Total	BCR Fosfo	
PI3K activado	PI3K complejo	P85 Y688
4EBP1	4EBP1 fosfo	T70, T37, T46
PRA540	PRA540 fosfo	T246

Tabla 2

Ensayos Total / Fosfo		Sitios Fosfo
TIE Total	TIE-2 Fosfo	Y992 (Y1179)
Jak 2 Total	JAK 2 Fosfo	Y1007/1008
STAT5 Total	STAT5 Fosfo	Y694/699
STAT3 Total	STAT3 Fosfo	Y705
FGFR1 total	FGFR1 Fosfo	Y 658, 766
FGFR2 total	FGFR 2 Fosfo	Y653
FGFR3 total	FGFR 3 Fosfo	
FGFR4 total	FGFR 4 Fosfo	
Axl total	Axl Fosfo	Y702
BAD total	BAD Fosfo	(S112) (S136)
RSK total	RSK Fosfo	(T359/5363)
PDK total	PDK1 Fosfo	(S241)
JAK1 y 3 total	JAK 1 y 3 Fosfo	
TSC2 total	TSC 2 Fosfo	5664, 5839
SGRP Total	SGRP Fosfo	5235/236

25 G. Marcadores genéticos

La determinación de la presencia o la ausencia de variantes alélicas (por ejemplo los PSN) en uno o más marcadores genéticos en una muestra (por ejemplo solos o en combinación con marcadores biológicos de otras categorías) también resulta útil en los métodos para ayudar o asistir en la predicción del curso de la enfermedad, para seleccionar una terapia de fármaco anti-TNF-α apropiada, para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF-α, para reducir la toxicidad asociada a la terapia con fármaco anti-TNF-α o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF-α.

Entre los ejemplos no limitativos de marcadores genéticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cualquiera de los genes de la ruta inflamatoria y los PSN correspondientes que pueden genotiparse tal como se indica en la Tabla 3 (por ejemplo un gen NOD2/CARD15, un gen de la ruta IL12/IL23, etc.). Preferentemente, se determina la presencia o la ausencia de por lo menos una variante alélica, por ejemplo un polimorfismo de un solo nucleótido (PSN), en el gen NOD2/CARD15 y/o uno o más genes en la ruta IL12/IL23. Ver, por ejemplo, Barrett *et al.*, Nat. Genet. 40:955-62, 2008, y Wang *et al.*, Amer. J. Hum. Genet. 84:399-405, 2009.

Tabla 3

Gen	PSN
NOD2 (R702W) -SNP8	rs2066844
NOD2 (G908R) -SNP12	rs2066845
NOD2 (3020insC) -SNP13	rs5743293
ATG16L1 (T300A)	rs2241880
IL23R (R381Q)	rs11209026
DLG5	rs2165047
NOD2/CARD15	rs2066847
IL23R	rs11465804
ATG16L1	rs3828309
MST1	rs3197999
PTGER4	rs4613763
IRGM	rs11747270
TNFSF15	rs4263839
ZNF365	rs10995271
NKX2-3	rs11190140
PTPN2	rs2542151
PTPN22	rs2476601
ITLN1	rs2274910
IL12B	rs10045431
CDKAL1	rs6908425
CCR6	rs2301436
JAK2	rs10758669
C11orf30	rs7927894
LRRK2, MUC19	rs11175593
ORMDL3	rs2872507
STAT3	rs744166
ICOSLG	rs762421
GCKR	rs780094
BTNL2, SLC26A3, HLA-DRB1, HLA-DQA1	rs3763313
PUS10	rs13003464
CCL2, CCL7	rs991804
LYRM4	rs12529198
SLC22A23	rs17309827
IL18RAP	rs917997
IL12RB2	rs7546245
IL12RB1	rs374326
CD3D	rs3212262
CD3G	rs3212262
CD247	rs704853
JUN	rs6661505
CD3E	rs7937334
IL18R1	rs1035127
CCR5	
MAPK14	rs2237093
IL18	rs11214108
IFNG	rs10878698
MAP2K6	rs2905443
STAT4	rs1584945
IL12A	rs6800657
TYK2	rs12720356
ETV5	rs9867846
MAPK8	rs17697885
IRGM	rs13361189
IRGM	rs4958847
IRGM	rs1000113
IRGM	rs11747270
TL1A/TNFSF15	rs6478109

ES 2 530 175 T3

TL1A/TNFSF15	rs6478108
TL1A/TNFSF15	rs4263839
PTN22	rs2476601
CCR6	rs1456893
CCR6	rs2301436
5p13/PTGER4	rs1373692
5p13/PTGER4	rs4495224
5p13/PTGER4	rs7720838
5p13/PTGER4	rs4613763
ITLN1	rs2274910
ITLN1	rs9286879
ITLN1	rs11584383
IBD5/5q31	rs2188962
IBD5/5q31	rs252057
IBD5/5q31	rs10067603
GCKR	rs780094
TNFRSF6B	rs1736135
ZNF365	rs224136
ZNF365	rs10995271
C11orf30	rs7927894
LRRK2;MUC19	rs1175593
IL-27	rs8049439
TLR2	rs4696480
TLR2	rs3804099
TLR2	rs3804100
TLR2	rs5743704
TLR2	rs2405432
TLR4 (D299G)	rs4986790
TLR4 (T399I)	rs4986791
TLR4 (S360N)	rs4987233
TLR9	rs187084
TLR9	rs352140
NFC4	rs4821544
KIF21B	rs11584383
IKZF1	rs1456893
C11orf30	rs7927894
CCL2,CCL7	rs991804
ICOSLG	rs762421
TNFAIP3	rs7753394
FLJ45139	rs2836754
PTGER4	rs4613763
ECM1	rs7511649
ECM1 (T130M)	rs3737240
ECM1 (G290S)	rs13294
GLI1 (G933D)	rs2228224
GLI1 (Q1100E)	rs2228226
MDR1 (3435C>T)	rs1045642
MDR1 (A893S/T)	rs2032582
MAGI2	rs6962966
MAGI2	rs2160322
IL26	rs12815372
IFNG,IL26	rs1558744
IFNG,IL26	rs971545
IL26	rs2870946
ARPC2	rs12612347
IL10,IL19	rs3024493
IL10,IL19	rs3024505
IL23R	rs1004819
IL23R	rs2201841

ES 2 530 175 T3

IL23R	rs11465804
IL23R	rs10889677
BTLN2	rs9268480
HLA-DRB1	rs660895
MEP1	rs6920863
MEP1	rs2274658
MEP1	rs4714952
MEP1	rs1059276
PUS10	rs13003464
PUS10	rs6706689
RNF 186	rs3806308
RNF186	rs1317209
RNF186	rs6426833
FCGR2A,C	rs10800309
CEP72	rs4957048
DLD,LAMB1	rs4598195
CAPN10,KIF1A	rs4676410
IL23R	rs11805303
IL23R	rs7517847
IL12B/p40	rs1368438
IL12B/p40	rs10045431
IL12B/p40	rs6556416
IL12B/p40	rs6887695
IL12B/p40	rs3212227
STAT3	rs744166
JAK2	rs10974914
JAK2	rs10758669
NKX2-3	rs6584283
NKX2-3	rs10883365
NKX2-3	rs11190140
IL18RAP	rs917997
LYRM4	rs12529198
CDKAL1	rs6908425
MAGI2	rs2160322
TNFRSF6B	rs2160322
TNFRSF6B	rs2315008
TNFRSF6B	rs4809330
PSMG1	rs2094871
PSMG1	rs2836878
PTPN2	rs2542151
MST1/3p21	rs9858542
MST1/3p21	rs3197999
SLC22A23	rs17309827
MHC	rs660895
XBP1	rs35873774
ICOSLG1	rs762421
BTLN2	rs3763313
BTLN2	rs2395185
BTLN2	rs9268480
ATG5	rs7746082
CUL2,CREM	rs17582416
CARD9	rs4077515
ORMDL3	rs2872507
ORMDL3	rs2305480

Entre los PSN adicionales útiles en el presente método se incluyen, por ejemplo, rs2188962, rs9286879, rs11584383, rs7746082, rs1456893, rs1551398, rs17582416, rs3764147, rs1736135, rs4807569, rs7758080 y rs8098673. Ver, por ejemplo, Barrett *et al.*, Nat. Genet. 40:955-62, 2008.

1. NOD2/CARD15

La determinación de la presencia o la ausencia de variantes alélicas tales como los PSN en el gen NOD2/CARD15 resulta particularmente útil en el presente método. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "variante de NOD2/CARD15" o "variante de NOD2" incluye una secuencia de nucleótidos de un gen NOD2 que contiene uno o más cambios en comparación con el gen NOD2 de tipo salvaje o una secuencia de aminoácidos de un polipéptido NOD2 que contiene uno o más cambios en comparación con la secuencia del polipéptido NOD2 de tipo salvaje. NOD2, también conocido como CARD15, se ha sido localizado en el locus IBD1 del cromosoma 16 y ha sido identificado mediante clonación posicional (Hugot *et al.*, Nature 411:599-603, 2001), así como una estrategia de gen candidato posicional (Ogura *et al.*, Nature 411:603-606, 2001; Hampe *et al.*, Lancet 357:1925-1928, 2001). El locus IBD1 presenta una puntuación elevada de ligamiento de puntos múltiples (LPM) para la enfermedad intestinal inflamatoria (LPM=5,7 en el marcador D16S411 en 16q12). Ver, por ejemplo, Cho *et al.*, Inflamm. Bowel Dis., 3:186-190, 1997; Akolkar *et al.*, Am. J. Gastroenterol. 96:1127-1132, 2001; Ohmen *et al.*, Hum. Mol. Genet. 5:1679-1683, 1996; Parkes *et al.*, Lancet 348:1588, 1996; Cavanaugh *et al.*, Ann. Hum. Genet. 62:291-8, 1998; Brant *et al.*, Gastroenterology 115:1056-1061, 1998; Curran *et al.*, Gastroenterology 115:1066-1071, 1998; Hampe *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 64:808-816, 1999; y Annese *et al.*, Eur. J. Hum. Genet. 7:567-573, 1999.

Las secuencias de ARNm (codificante) y polipeptídica de NOD2 humana se proporcionan en, por ejemplo, GenBank nº de acceso NM_022162 y NP_071445, respectivamente. Además, la secuencia completa del clon Rp11-327F22 del cromosoma 16 humano, que incluye NOD2, se proporciona en, por ejemplo, GenBank nº de acceso AC007728. Además, la secuencia de NOD2 de otras especies puede encontrarse en la base de datos GenBank.

La proteína NOD2 contiene dominios amino-terminales de reclutamiento de caspasa (DRCA) que pueden activar NF-kappa B (NF-kB) y varios dominios repetidos ricos en leucinas carboxi-terminales (Ogura *et al.*, J. Biol. Chem. 276:4812-4818, 2001). NOD2 presenta homología estructura con el regulador de apoptosis Apaf-1/CED-4 y una clase de productos génicos resistentes a enfermedades vegetales (Ogura *et al.*, *supra*). De manera similar a los productos génicos resistentes a enfermedades vegetales, NOD2 presenta un dominio efecto aminoterminal, un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucinas (RRL). NOD2 de tipo salvaje activa el factor nuclear NF-kappa B, sensibilizándolo frente a lipopolisacáridos bacterianos (LPS, Ogura *et al.*, *supra*; Inohara *et al.*, J. Biol. Chem. 276:2551-2554, 2001). NOD2 puede funcionar como receptor intercelular para LPS, requiriéndose las repeticiones ricas en leucinas para la sensibilidad.

Se han descrito previamente variaciones en tres polimorfismos de un solo nucleótido en la región codificante de NOD2. Estos tres PSN, denominados R702W ("PSN 8"), G908R ("PSN 12") y 1007fs ("PSN 13") se encuentran situados en la región carboxi-terminal del gen NOD2 (Hugot *et al.*, *supra*). Una descripción adicional de PSN 8, PSN 12 y PSN 13, así como PSN adicionales en el gen NOD2 adecuados para la utilización en el método, pueden encontrarse en, por ejemplo, las patentes US nº 6.835.815, nº 6.858.391 y nº 7.592.437 y en las publicaciones de patente US nº 2003/0190639, 2005/0054021 y 2007/0072180.

Puede localizarse una variante de NOD2 en una región codificante del locus NOD2, por ejemplo dentro de una región codificante de varias repeticiones ricas en leucinas en la parte carboxi-terminal del polipéptido NOD2. Entre dichas variantes de NOD2 situadas en la región repetida rica en leucinas de NOD2 se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, R702W ("PSN 8") y G908R ("PSN 12"). Una variante de NOD2 útil en el método también puede codificar un polipéptido NOD2 que capacidad reducida de activar NF-kappa B en comparación con la activación de NF-kappa B por un polipéptido NOD2 de tipo salvaje. A título de ejemplo no limitativo, la variante de NOD2 1007fs ("PSN 13") resulta en un polipéptido NOD2 truncado que presenta una capacidad reducida de inducir NF-kappa B en respuesta a la estimulación con LPS (Ogura *et al.*, Nature 411:603-606, 2001).

Una variante de NOD2 útil en el método puede ser, por ejemplo, R702W, G908R ó 1007fs. R702W, G908R y 1007fs se encuentran localizados dentro de la región codificante de NOD2. Un método de la invención puede poner en práctica con la variante R702W de NOD2. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "R702W" incluye un polimorfismo de un solo nucleótido dentro del exón 4 del gen NOD2, que aparece dentro de un triplete codificante del aminoácido 702 de la proteína NOD2. El alelo de NOD2 de tipo salvaje contiene un residuo de citosina (c) en la posición 138.991 de la secuencia AC007728, que se encuentra dentro de un triplete codificante de una arginina en el aminoácido 702. La variante R702W de NOD2 contiene un residuo de timina (t) en la posición 138.991 de la secuencia AC007728, resultando en una sustitución de arginina (R) por triptófano (W) en el aminoácido 702 de la proteína NOD2. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, dicha variante de NOD2 se denomina "R702W" o "702W" y también puede denominarse "R675W" basándose en el sistema anterior de numeración de Hugot *et al.*, *supra*. Además, la variante R702W también es conocida como alelo "PSN 8" o un alelo "2" en PSN 8. El número ID de PSN del NCBI para R702W o PSN 8 es rs2066844. La presencia de la variante R702W de NOD2 y otras variantes de NOD2 pueden detectarse convenientemente mediante, por ejemplo, ensayos de discriminación alélica o análisis de secuencias.

También puede ponerse en práctica un método de la invención con la variante G908R de NOD2. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "G908R" incluye un polimorfismo de un solo nucleótido dentro del exón 8 del gen NOD2, que aparece dentro de un triplete codificante del aminoácido 908 de la proteína NOD2. El aminoácido 908 se encuentra localizado dentro de una región repetida rica en leucinas del gen NOD2. El alelo de NOD2 de tipo salvaje contiene un residuo de guanina (g) en la posición 128.377 de la secuencia AC007728, que se encuentra dentro de un triplete codificante de glicina en el aminoácido 908. La variante G908R de NOD2 contiene un residuo de citosina (c) en la posición 128.377 de la secuencia AC007728, resultando en una sustitución de glicina (G) por arginina (R) en el aminoácido 908 de la proteína NOD2. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, dicha variante de NOD2 se denomina "G908R" o "908R" y también puede denominarse "G881 R" basándose en el sistema anterior de numeración de Hugot *et al., supra*. Además, la variante G908R también es conocida como alelo "PSN 12" o un alelo "2" en PSN 12. El número ID de PSN del NCBI para G908R o PSN 12 es rs2066845.

También puede ponerse en práctica un método con la variante 1007fs de NOD2. Esta variante es una inserción de un solo nucleótido que resulta en un desplazamiento de marco en la décima repetición rica en leucinas de la proteína NOD2 y le sigue un codón de parada prematuro. El truncado resultante de la proteína NOD2 aparentemente evita la activación de NF-kappaB en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos (Ogura *et al., supra*). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "1007fs" incluye un polimorfismo de un solo nucleótido dentro del exón 11 del gen NOD2, que se encuentra dentro de un triplete codificante del aminoácido 1007 de la proteína NOD2. La variante 1007fs contiene una citosina que ha sido añadida a la posición 121.139 de la secuencia AC007728, resultando en una mutación de desplazamiento de marco en el aminoácido 1007. De acuerdo con lo anterior, dicha variante de NOD2 se denomina "1007fs" y también puede denominarse "3020insC" o "980fs" basándose en el sistema de numeración anterior de Hugot *et al., supra*. Además, la variante 1007fs de NOD2 también es conocida como alelo "PSN 13" o un alelo "2" en PSN 13. El número ID de PSN del NCBI para 1007fs o PSN 13 es rs2066847.

El experto en la materia reconoce que un alelo variante particular de NOD2 u otro alelo polimórfico puede definirse convenientemente, por ejemplo en comparación con un individuo de referencia del Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH), tal como el individuo designado 1347-02 (Dib *et al., Nature* 380:152-154, 1996) utilizando ADN de referencia disponible comercialmente, obtenido, por ejemplo, de PE Biosystems (Foster City, CA). Además, puede obtenerse información específica sobre las PSN obtenidas de la dbPSN del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

También puede localizarse una variante de NOD2 en una región no codificante del locus NOD2. Entre las regiones no codificantes se incluyen, por ejemplo, secuencias de intrón, así como secuencias 5' y 3' no traducidas. Un ejemplo no limitativo de un alelo variante de NOD2 situado en una región no codificante del gen NOD2 es la variante JW 1, que se describe en Sugimura *et al., Am. J. Hum. Genet.* 72:509-518, 2003, y en la publicación de patente US nº 2007/0072180. Entre los ejemplos de alelos variantes de NOD2 situados en la región 3' no traducida del gen NOD2 se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los alelos variantes JW15 y JW16, que se describen en la publicación de patente US nº 2007/0072180. Entre los ejemplos de alelos variantes de NOD2 situados en la región 5' no traducida (por ejemplo la región promotora) del gen NOD2 se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los alelos variantes JW17 y JW18, los cuales se describen en la publicación de patente US nº 2007/0072180.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "alelo variante JW1" incluye una variación genética en el nucleótido 158 de la secuencia intermedia 8 (intrón 8) del gen NOD2. En relación a la secuencia AC007728, el alelo variante JW1 se encuentra situado en la posición 128.143. La variación genética en el nucleótido 158 del intrón 8 puede ser, aunque sin limitación, una sustitución de un solo nucleótido, sustituciones de múltiples nucleótidos o una delección o inserción de uno o más nucleótidos. La secuencia de tipo salvaje del intrón 8 presenta una citosina en la posición 158. A título de ejemplos no limitativos, un alelo variante JW1 puede presentar una sustitución de citosina (c) por adenina (a), citosina (c) por guanina (g) o de citosina (c) por timina (t) en el nucleótido 158 del intrón 8. El alelo variante JW1 puede ser un cambio de una citosina (c) por una timina (t) en el nucleótido 158 del intrón 8 de NOD2.

La expresión "alelo variante JW15" incluye una variación genética en la región 3' no traducida de NOD2 en la posición nucleotídica 118.790 de la secuencia AC007728. La variación genética en el nucleótido 118.790 puede ser, aunque sin limitación, una sustitución de un solo nucleótido, sustituciones de múltiples nucleótidos, o una delección o inserción de uno o más nucleótidos. La secuencia de tipo salvaje presenta una adenina (a) en la posición 118.790. A título de ejemplos no limitativos, un alelo variante JW15 puede presentar una sustitución de adenina (a) por citosina (c), de adenina (a) por guanina (g) o de adenina (a) por timina (t) en el nucleótido 118.790. El alelo variante JW15 puede ser un cambio de una adenina (a) por citosina (c) en el nucleótido 118.790.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "alelo variante JW16" incluye una variación genética en la región 3' no traducida de NOD2 en la posición nucleotídica 118.031 de la secuencia AC007728. La variación genética en el nucleótido 118.031 puede ser, aunque sin limitación, una sustitución de un solo nucleótido, sustituciones de

múltiples nucleótidos, o una delección o inserción de uno o más nucleótidos. La secuencia de tipo salvaje presenta una guanina (g) en la posición 118.031. A título de ejemplos no limitativos, un alelo variante JW16 puede presentar una sustitución de guanina (g) por citosina (c), de guanina (g) por adenina (a) o de guanina (g) por timina (t) en el nucleótido 118.031. El alelo variante JW16 puede ser un cambio de una guanina (g) por adenina (a) en el nucleótido 118.031.

La expresión "alelo variante JW17" incluye una variación genética en la región 5' no traducida de NOD2 en la posición nucleotídica 154.688 de la secuencia AC007728. La variación genética en el nucleótido 154.688 puede ser, aunque sin limitación, una sustitución de un solo nucleótido, sustituciones de múltiples nucleótidos, o una delección o inserción de uno o más nucleótidos. La secuencia de tipo salvaje presenta una citosina (c) en la posición 154.688. A título de ejemplos no limitativos, un alelo variante JW17 puede presentar una sustitución de citosina (c) por guanina (g), de citosina (c) por adenina (a) o de citosina (c) por timina (t) en el nucleótido 154.688. El alelo variante JW17 puede ser un cambio de una citosina (c) por timina (t) en el nucleótido 154.688.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "alelo variante JW18" incluye una variación genética en la región 5' no traducida de NOD2 en la posición nucleotídica 154.471 de la secuencia AC007728. La variación genética en el nucleótido 154.471 puede ser, aunque sin limitación, una sustitución de un solo nucleótido, sustituciones de múltiples nucleótidos, o una delección o inserción de uno o más nucleótidos. La secuencia de tipo salvaje presenta una citosina (c) en la posición 154.471. A título de ejemplos no limitativos, un alelo variante JW18 puede presentar una sustitución de citosina (c) por guanina (g), de citosina (c) por adenina (a) o de citosina (c) por timina (t) en el nucleótido 154.471. El alelo variante JW18 puede ser un cambio de una citosina (c) por timina (t) en el nucleótido 154.471.

Se entiende que los métodos pueden ponerse en práctica con dichos alelos variantes u otros alelos variantes de NOD2 situados en una región codificante o una región no codificante (por ejemplo intrón o región promotora) del locus NOD2. Se entiende además que los métodos pueden implicar la determinación de la presencia de una, dos, tres, cuatro o más variantes de NOD2, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, los alelos PSN 8, PSN 12 y PSN 13, y otras variantes de región codificante, así como de no codificante.

V. Ejemplos

El presente método se describe en mayor detalle mediante ejemplos específicos. Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo. El experto en la materia podrá reconocer fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse rindiendo esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Nuevo ensayo de cambio de movilidad para la medición de niveles de fármacos biológicos anti-TNF- α

El presente ejemplo ilustra un nuevo ensayo homogéneo para medir la concentración de fármaco anti-TNF- α en una muestra de paciente (por ejemplo de suero) utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño para detectar la unión del fármaco anti-TNF- α a TNF- α marcado fluorescentemente. El ensayo resulta ventajoso porque evita la necesidad de etapas de lavado, utiliza fluoróforos que permiten la detección en los espectros visible y/o de IR que reduce el fondo y problemas de interferencia con el suero, incrementa la capacidad de detectar fármacos anti-TNF- α en pacientes con un título bajo debido a la elevada sensibilidad de la detección con marcaje fluorescente y se produce como una reacción en fase líquida, reduciendo de esta manera la probabilidad de cualesquiera cambios en el epítipo por unión a una superficie sólida, tal como una placa de ELISA.

En un método ejemplar, se marca TNF- α con un fluoróforo (por ejemplo Alexa₆₄₇), en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como de IR. El TNF- α marcado se incubaba con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir que se una el fármaco anti-TNF- α presente en el suero. El TNF- α marcado también puede incubarse con cantidades conocidas del fármaco anti-TNF- α en una reacción en fase líquida para generar una curva estándar. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión del fármaco anti-TNF- α a TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico en comparación con TNF- α marcado solo. La concentración del fármaco anti-TNF- α presente en la muestra de suero seguidamente puede compararse con la curva estándar y los controles.

La figura 1 muestra un ejemplo del ensayo del presente método, en el que se utilizó la HPLC de exclusión por tamaño para detectar la unión entre TNF α -Alexa₆₄₇ y HUMIRATM (adalimumab). Tal como se muestra en la figura 1, la unión de HUMIRATM a TNF- α -Alexa₆₄₇ causó un desplazamiento del pico de TNF- α -Alexa₆₄₇ hacia la izquierda.

La figura 2 muestra las curvas de dosis-respuesta de la unión de HUMIRATM a TNF α -Alexa₆₄₇. En particular, la figura 2A muestra que HUMIRATM incrementó de manera dependiente de la dosis el desplazamiento de TNF- α -Alexa₆₄₇ en el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño. La figura 2B muestra que la presencia de 1% de suero humano no presentó ningún efecto significativo sobre el desplazamiento de TNF- α -Alexa₆₄₇ en el ensayo de cromatografía de

exclusión por tamaño. La figura 2C muestra que la presencia de suero agrupado positivo para RF no presentó ningún efecto significativo sobre el desplazamiento de TNF- α -Alexa₆₄₇ en el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño.

5 De esta manera, el presente ejemplo demuestra la utilidad del presente método en el seguimiento de pacientes que reciben un fármaco anti-TNF- α tal como HUMIRATM: (1) para guiar en la determinación de la dosis de fármaco apropiada, (2) para evaluar la farmacocinética del fármaco, por ejemplo para determinar si el fármaco está siendo eliminado del cuerpo con excesiva rapidez, y (3) para guiar las decisiones de tratamiento, por ejemplo si cambiar del fármaco anti-TNF- α actual a un inhibidor de TNF- α diferente o a otro tipo de terapia.

10

Ejemplo 2. Nuevo ensayo de cambio de movilidad para la medición de los niveles de HACA y HAHA

15 El presente ejemplo ilustra un nuevo ensayo homogéneo para medir la concentración de autoanticuerpos (por ejemplo HACA y/o HAHA) en una muestra de paciente (por ejemplo de suero) utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño para detectar la unión del fármaco anti-TNF- α a TNF- α marcado fluorescentemente. El ensayo resulta ventajoso porque evita la necesidad de etapas de lavado, las cuales eliminan HACA y HAHA de baja afinidad, utiliza fluoróforos que permiten la detección en los espectros visible y/o de IR que reduce el fondo y los problemas de interferencia con el suero, incrementa la capacidad de detectar HACA y HAHA en pacientes con un título bajo debido a la elevada sensibilidad de la detección con marcaje fluorescente y se produce como una reacción en fase líquida, reduciendo de esta manera la probabilidad de cualesquiera cambios en el epítipo por unión a una superficie sólida, tal como una placa de ELISA.

20 La utilidad clínica de la medición de autoanticuerpos (por ejemplo HACA, HAHA, etc.) que se generan contra inhibidores de TNF- α queda ilustrada por el hecho de que las HACA se detectaron en 53%, 21% y 7% de los pacientes de artritis reumatoide tratados con 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg de infliximab. Al combinar infliximab con metotrexato, la incidencia de anticuerpos fue menor, 15%, 7% y 0%, lo que indica que la terapia inmunosupresora concurrente resulta eficaz en la reducción de las respuestas antifármaco, aunque también indica que una dosis elevada de anticuerpo anti-TNF- α podría conducir a tolerancia. En la enfermedad de Crohn, se ha informado de una incidencia mucho más alta; tras la quinta infusión, el 61% de los pacientes presentaba HACA. Se acortó la respuesta clínica en presencia de HACA. Ver Rutgeerts, N. Engl. J. Med. 348:601-608, 2003. Un estudio retrospectivo de infliximab y niveles de HACA medidos durante un periodo de 3 años entre 2005 y 2008 en 155 pacientes demostró que se detectaban HACA en 22,6% (N=35) de los pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria. Ver Afif *et al.*, "Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Levels in Patients with Inflammatory Bowel Disease"; artículo presentado en la Digestive Disease Week; 30 de mayo a 3 de junio, 2009; Chicago, IL. Los autores concluyeron que cambiar el tratamiento basándose en los síntomas clínicos únicamente podría conducir a un control inadecuado.

25 El ensayo de cambio de movilidad homogéneo resulta ventajoso frente a los métodos actuales, tales como el ensayo de puente mostrado en la figura 3 para medir las concentraciones de los autoanticuerpos (por ejemplo HACA y/o HAHA) en una muestra del paciente debido a que el método inventivo es capaz de medir la concentración de autoanticuerpos tales como HACA sin unión no específica e interferencia con la fase sólida de la placa ELISA, sin interferencia del fármaco anti-TNF- α (por ejemplo con el ensayo de puente, deben realizarse mediciones de HACA a niveles valle del fármaco anti-TNF- α) y sin ninguna dependencia de la multivalencia del anticuerpo (por ejemplo, los anticuerpos IgG4 no se detectan utilizando el ensayo de puente debido a que los anticuerpos IgG4 son biespecíficos y no pueden entrecruzar el mismo antígeno). De esta manera, el presente método presenta por lo menos las ventajas siguientes respecto a los métodos actuales: evita la unión de los antígenos a las superficies sólidas (se evita la desnaturalización); elimina el efecto de IgG4; supera los problemas de valle del anticuerpo terapéutico; detecta anticuerpos con afinidades débiles; elimina la unión no específica de las IgG irrelevantes e incrementa la sensibilidad y especificidad de la detección.

30 En un método ejemplar, se marca un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo REMICADETM) con un fluoróforo (por ejemplo Alexa₆₄₇), en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como de IR. El fármaco anti-TNF- α marcado se incuba con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir que se unan HACA y HAHA presentes en el suero. El fármaco anti-TNF- α marcado también puede incubarse con cantidades conocidas del anticuerpo anti-IgG en una reacción en fase líquida para generar una curva estándar. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión de los autoanticuerpos a fármaco anti-TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico en comparación con fármaco marcado solo. La concentración de HACA y HAHA presentes en la muestra de suero seguidamente puede compararse con la curva estándar y los controles. La figura 4 ilustra una descripción general ejemplar de los ensayos de detección de autoanticuerpos para medir las concentraciones de HACA/HAHA generados contra REMICADETM. En determinados casos, los niveles elevados de HACA/HAHA indican que la terapia actual con REMICADETM debería cambiarse a otro fármaco anti-TNF- α , tal como HUMIRATM.

35

40

45

50

55

60

El principio de este ensayo se basa en el cambio de movilidad del complejo Remicade unido a anticuerpo y marcado con Alexa₆₄₇ frente a Remicade marcado con Alexa₆₄₇ pero libre en cromatografía líquida de alto rendimiento-exclusión por tamaño (HPLC-ET) debido al incremento del peso molecular del complejo.

5 La cromatografía en el presente ejemplo se llevó a cabo en un sistema de HPLC Agilent-1200 utilizando una columna Bio-Sep de 300x7,8 mm SEC-3000 (Phenomenex) con un intervalo de fraccionamiento de pesos moleculares de 5.000 a 700.000 y una fase móvil de 1X PBS, pH 7,4, a un caudal de 0,5 ml/min con detección de UV a 650 nm. Se cargó un volumen de muestra de 100 µl en la columna para cada análisis.

10 El complejo de Remicade marcado con Alexa₆₄₇ unido a anticuerpo se forma mediante la incubación de una cantidad conocida del anticuerpo y Remicade marcado con Alexa₆₄₇ en el tampón de elución 1X PBS, pH 7,3, a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis de HPLC-ET.

15 La figura 5 muestra un análisis de dosis-respuesta de unión de anticuerpo anti-IgG humano a REMICADE™-Alexa₆₄₇ detectado utilizando el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño. La unión del anticuerpo anti-IgG a REMICADE™-Alexa 647 causó un desplazamiento del pico de REMICADE™-Alexa 647 hacia la izquierda. La figura 6 muestra un segundo análisis de dosis-respuesta de unión de anticuerpo anti-IgG humano a REMICADE™-Alexa₆₄₇ detectado utilizando el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño. Las cantidades más altas de anticuerpo anti-IgG resultaron en un incremento dependiente de la dosis de la formación de complejos de anti-IgG/REMICADE™-Alexa 647, tal como indica el desplazamiento del pico de REMICADE™-Alexa₆₄₇ hacia la izquierda. La figura 7 muestra curvas de dosis-respuesta de unión de anticuerpo anti-IgG humano a REMICADE™-Alexa₆₄₇.

25 La figura 8 muestra la formación del inmunocomplejo REMICADE™-Alexa₆₄₇ en suero humano normal y suero positivo para HACA detectados utilizando el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño con 100 µl de muestra inyectada. Tal como se muestra en la figura 8, la unión de HACA presente en muestras del paciente a REMICADE™-Alexa₆₄₇ causó un desplazamiento del pico de REMICADE™-Alexa₆₄₇ hacia la izquierda. De esta manera, el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño resulta particularmente ventajoso porque mide HACA en presencia de REMICADE™, puede utilizarse mientras el paciente se encuentra bajo terapia, mide la unión de HACA tanto débil como fuerte, es un ensayo de cambio de movilidad de mezcla y lectura, y puede extenderse a otros enfoques que utilizan REMICADE™ marcado para el equilibrado con HACA y REMICADE™.

35 La figura 9 proporciona un resumen de las mediciones de HACA de 20 muestras de suero de pacientes que se llevaron a cabo utilizando el ensayo de puente o el ensayo de cambio de movilidad. El presente estudio comparativo demuestra que los presentes métodos presentan una sensibilidad incrementada respecto a los métodos actuales debido a que 3 muestras que eran negativas para HACA medido utilizando el puente de ensayo eran realmente positivas para HACA al medirlas utilizando el ensayo de cambio de movilidad (ver los pacientes n° SK07070305, SK07070595 y SK07110035).

40 De esta manera, el presente ejemplo demuestra la utilidad del presente método en el seguimiento de pacientes que reciben un fármaco anti-TNF-α (por ejemplo REMICADE™) para detectar la presencia o el nivel de autoanticuerpos (por ejemplo HACA y/o HAHA) contra el fármaco, debido a que dichas respuestas inmunológicas pueden asociarse a reacciones de hipersensibilidad y cambios drásticos en la farmacocinética y distribución biológica del fármaco anti-TNF-α que impiden el tratamiento posterior con el fármaco.

50 En conclusión, los Ejemplos 1 y 2 demuestran que TNF-α y los anticuerpos anti-TNF-α pueden marcarse eficientemente con Alexa₆₄₇. Al incubar TNF-α-Alexa₆₄₇ marcado con anticuerpos anti-TNF-α, se desplazó el tiempo de retención del complejo marcado de TNF-α/anticuerpo anti-TNF-α y la cantidad de anticuerpo anti-TNF-α que causaba el desplazamiento pudo cuantificarse mediante HPLC. Además, al incubar anticuerpo anti-TNF-α marcado con anticuerpo anti-IgG humana, se desplazó el tiempo de retención del complejo marcado de anticuerpo anti-TNF-α/anticuerpo anti-IgG y la cantidad de anticuerpo anti-IgG que causaba el desplazamiento pudo cuantificarse mediante HPLC. Además, se demostró que el bajo contenido de suero del sistema de ensayo presentaba poco efecto sobre el análisis de HPLC. Finalmente, pudo generarse una curva estándar para los ensayos de anticuerpo anti-TNF-α y HACA/HAHA y pudo utilizarse para cuantificar los niveles séricos del paciente de anticuerpo anti-TNF-α o de HACA/HAHA. Ventajosamente, el presente método proporciona en determinados aspectos un ensayo de cambio de movilidad, tal como un ensayo homogéneo de mezcla y lectura desarrollado para medir tanto fármaco como anticuerpos contra el fármaco. Se generó una curva estándar para los fármacos biológicos anti-TNF-α Remicade y Humira y también para los anticuerpos HACA contra Remicade. El formato de ensayo de cambio de movilidad, al contrario que el ELISA, elimina el recubrimiento con antígenos de la superficie sólida y no resulta afectado por la unión no específica de IgG no relevantes. El formato de ensayo es simple, aunque muy sensible y puede utilizarse para detectar todos los fármacos biológicos anti-TNF-α (por ejemplo Remicade, Humira, Enbrel y Cimzia), así como el anticuerpo neutralizador (anti-Remicade™) en el suero del paciente.

Ejemplo 3. Medición de los niveles de anticuerpos anti quiméricos humanos (HACA) y de infliximab (IFX) en suero de paciente utilizando un nuevo ensayo de cambio de movilidad.

5 RESUMEN

Antecedentes: el infliximab (IFX) es un terapéutico anticuerpo monoclonal quimérico contra TNF- α que se ha demostrado que resulta eficaz en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide (AR) y la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). Sin embargo, se han encontrado anticuerpos contra IFX en algunos pacientes tratados con IFX mediante la detección de anticuerpos anti quiméricos humanos (HACA), lo que podría reducir la eficacia del fármaco o inducir efectos adversos. El seguimiento de los niveles de HACA e IFX en pacientes individuales podría ayudar a optimizar la dosificación y el tratamiento con IFX. Los métodos actuales para detectar HACA se basan en ensayos de fase sólida, los cuales están limitados por el hecho de que la presencia de IFX en la circulación podría enmascarar la presencia de HACA y, por lo tanto, la medición únicamente puede realizarse por lo menos 8 semanas después de una dosis de IFX. Además, este lapso de tiempo confunde adicionalmente los ensayos debido a la rápida eliminación de la circulación sanguínea de los complejos inmunológicos de elevado peso molecular. Para superar estas desventajas, los presentes inventores han desarrollado y evaluado un nuevo método para medir los niveles séricos de IFX y HACA en pacientes tratados con IFX.

Métodos: se ha desarrollado un nuevo ensayo de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo, en fase sólida, de exclusión por tamaño (ET)-HPLC para medir los niveles de HACA e IFX en suero procedente de pacientes tratados con IFX. El complejo inmunológico (por ejemplo TNF- α /IFX o IFX/HACA), TNF- α o IFX libre, y la proporción de unido/libre pueden resolverse y calcularse con elevada precisión. Se determinaron las concentraciones séricas de IFX o HACA con curvas estándares generadas mediante la incubación con diferentes concentraciones de IFX o suero agrupado positivo para HACA. Mediante la utilización de este nuevo ensayo los presentes inventores midieron los niveles de IFX y HACA en sueros recogidos de pacientes de EII tratados con IFX que habían recaído y compararon los resultados con los obtenidos mediante el ensayo tradicional de ELISA de puente.

Resultados: se generaron curvas de dosis-respuesta con el nuevo ensayo con una elevada sensibilidad. Se demostró la detección de HACA en presencia de un exceso de IFX. En las 117 muestras de suero procedentes de pacientes tratados con IFX, se encontraron 65 muestras con niveles de IFX superiores al límite de detección y el promedio fue de 11,0+6,9 mg/ml. Para los niveles de HACA, se encontró que 33 muestras (28,2%) eran positivas, mientras que el ensayo de ELISA de puente detectó únicamente 24 muestras positivas. Los presentes inventores identificaron además 9 falsos negativos y 9 falsos positivos en las muestras determinadas mediante el ensayo de puente. Se encontró que los niveles de HACA se encontraban incrementados en 11 pacientes durante el curso del tratamiento de IFX, mientras que se encontró que los niveles de IFX se encontraban significativamente reducidos.

Conclusiones: se ha desarrollado un nuevo ensayo de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo, en fase líquida, para medir los niveles de IFX y HACA en suero procedente de pacientes tratados con IFX. El ensayo presentaba elevadas sensibilidad y precisión, y los resultados obtenidos eran reproducibles. El presente nuevo ensayo puede utilizarse ventajosamente para medir los niveles de HACA e IFX mientras los pacientes se encuentran bajo terapia.

45 INTRODUCCIÓN

El factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) desempeña un papel crucial en la patogénesis de las enfermedades autoinmunitarias, tales como la enfermedad de Crohn (EC) y la artritis reumatoide (AR). Está bien documentado que el bloqueo de TNF- α con anticuerpos terapéuticos tales como el infliximab (IgG1 κ monoclonal quimérico humano-murino) o adalimumab (anticuerpo monoclonal totalmente humano) reduce la actividad de la enfermedad en la EC y la AR. Sin embargo, aproximadamente 30% a 40% de los pacientes no responden a la terapia anti-TNF- α y algunos pacientes necesitan dosis más altas o ajustes de la frecuencia de dosificación debido a la falta de una respuesta suficiente. Las diferentes de biodisponibilidad y farmacocinética del fármaco entre pacientes individuales podría contribuir al fracaso del tratamiento. La inmunogenicidad de los fármacos, que provoca que los pacientes desarrollen HACA/HAHA, podría resultar en un abanico de reacciones adversas, desde una respuesta alérgica leve a un choque anafiláctico. Estos problemas ya han sido reconocidos por muchos investigadores, organismos de control de medicamentos, compañías aseguradoras sanitarias y fabricantes de medicamentos. Además, muchos pacientes con un fracaso de respuesta secundario a un fármaco anti-TNF- α se benefician de un cambio a otro fármaco anti-TNF- α , lo que sugiere que los anticuerpos neutralizadores dirigidos específicamente contra la proteína utilizada para el tratamiento podría desempeñar un papel (Radstake *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 68(11):1739-45, 2009). Por lo tanto, se justifica el seguimiento de los pacientes para los niveles de fármaco y HACA/HAHA de manera que pueda adaptarse la administración del fármaco al paciente individual y pueden administrarse terapias prolongadas de manera efectiva y económica con un riesgo reducido o nulo para los pacientes (Bendtsen *et al.*, Scand. J. Gastroenterol. 44(7):774-81, 2009).

Se han utilizado varios inmunoensayos ligados a enzima para evaluar los niveles circulantes de fármacos y de HACA/HAHA. La figura 10 proporciona un resumen de los ensayos actuales disponibles para la medición de HACA en comparación con el nuevo ensayo de HACA del presente método. Una de las limitaciones de las actuales metodologías es que los niveles de anticuerpos son difíciles de medir cuando hay una cantidad medible de fármaco en la circulación. En contraste con los métodos en fase sólida actuales para detectar HACA en los que las mediciones sólo pueden llevarse a cabo por lo menos 8 semanas después de una dosis de IFX, el nuevo ensayo del presente método es un ensayo sin marcaje radioactivo, en fase líquida, de exclusión por tamaño (ET)-HPLC que es capaz de medir los niveles de HACA e IFX en suero procedente de pacientes mientras están bajo tratamiento con IFX.

A continuación se proporcionan los argumentos para medir las concentraciones séricas de fármacos biológicos anti-TNF- α y anticuerpos contra fármacos biológicos de TNF- α en pacientes: (1) para estudios de FC en ensayos clínicos, (2) puede ser un requerimiento de la FDA durante ensayos clínicos para el seguimiento de la respuesta inmunológica del paciente al fármaco biológico, (3) para realizar un seguimiento de la respuesta del paciente al fármaco biológico mediante la medición de HACA o HAHA para guiar la dosificación del fármaco para cada paciente, y (4) para la utilización como guía para el cambio a un fármaco biológico diferente en el caso de que fracase el fármaco inicial.

MÉTODOS

Análisis de HPLC-ET de los niveles de infliximab (IFX) en el suero del paciente. Se marcó el TNF- α recombinante humano con un fluoróforo ("FI", tal como, por ejemplo, Alexa Fluor[®] 488) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó TNF- α marcado con diferentes cantidades de IFX o suero de paciente durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron muestras de 100 μ l mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC. Se utilizó DFL para realizar el seguimiento del TNF- α -FI libre y el complejo inmunológico TNF- α -FI unido basándose en sus tiempos de retención. Se calcularon los niveles de IFX a partir de la curva estándar.

Análisis de HPLC-ET de los niveles de HACA en el suero del paciente. Se marcó IFX purificado con FI. El IFX marcado se incubó con diferentes diluciones de suero agrupado positivo para HACA o suero de paciente diluido durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron muestras de 100 μ l mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC. Se utilizó DFL para realizar el seguimiento del IFX-FI libre y el complejo inmunológico IFX-FI unido basándose en sus tiempos de retención. Se utilizó la proporción de IFX-FI unido a libre para determinar el nivel de HACA.

Procedimiento de ensayo de cambio de movilidad para medir HACA en suero. El principio de este ensayo se basa en el cambio de movilidad del complejo de infliximab (IFX) marcado con FI unido a HACA frente a IFX marcado con FI pero libre en cromatografía líquida de alto rendimiento-exclusión por tamaño (HPLC-ET) debido al incremento del peso molecular del complejo. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de HPLC Agilent-1200 utilizando una columna Bio-Sep de 300x7,8 mm SEC-3000 (Phenomenex) con un intervalo de fraccionamiento de pesos moleculares de 5.000 a 700.000 y una fase móvil de 1X PBS, pH 7,3, a un caudal de 0,5 a 1,0 ml/min con detección DFL. Se cargó un volumen de muestra de 100 μ l en la columna para cada análisis. El complejo de IFX marcado con FI unido a HACA se formó mediante la incubación de suero procedente de pacientes tratados con IFX e IFX marcado con FI en el tampón 1X PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis de HPLC-ET. El ensayo también se llevó a cabo en presencia de diversos agentes de interferencia, tales como factor reumatoide y TNF- β , con el fin de validar el ensayo.

RESULTADOS:

La figura 11 muestra la separación del complejo de IFX-FI unido a HACA respecto de IFX-FI libre debido al cambio de movilidad del complejo de alto peso molecular. Tal como puede observarse en los paneles c y d, el tiempo de retención del pico fluorescente se desplazó de 21,8 min. a 15,5-19,0 min. A mayor cantidad presente de HACA en la mezcla de reacción, queda menos IFX-FI libre en el cromatograma y se forma más complejo inmunológico. La figura 12 muestra las curvas de dosis-respuesta del cambio del pico fluorescente causado por la adición de HACA. Utilizando la muestra positiva para HACA, los presentes inventores pudieron detectar un desplazamiento de pico con diluciones 1:1.000 del suero.

La figura 13 muestra la separación del complejo de TNF- α -FI unido a IFX respecto de TNF- α -FI libre debido al cambio de movilidad del complejo de alto peso molecular. Tal como puede observarse en los paneles c y d, el tiempo de retención del pico fluorescente se desplazó de 24 min. a 13-19,5 min. A mayor cantidad presente de IFX en la mezcla de reacción, queda menos TNF- α -FI libre en el cromatograma y se forma más complejo inmunológico. La figura 14 muestra las curvas de dosis-respuesta del cambio del pico de TNF- α -FI causado por la adición de IFX. Basándose en el IFX añadido, el límite de detección es 10 ng/ml de IFX en el suero.

El nuevo ensayo de cambio de movilidad se validó sometiendo a ensayo muestras de suero de pacientes positivos y negativos para HACA medidos mediante el ensayo de puente (Tabla 4). Utilizando este ensayo los presente inventores analizaron muestras de suero de 50 pacientes sanos y 117 pacientes de EII tratados con IFX. La totalidad de las muestras de 50 sujetos sanos presentaba un nivel de IFX inferior al límite de detección, mientras que 65 de las muestras de pacientes presentaban una concentración media de IFX de 11,0 mg/ml. La Tabla 5 muestra los niveles de HACA en el suero de controles sanos y pacientes de EII tratados con IFX medidos mediante ensayo de puente y ensayo de cambio de movilidad. El ensayo de puente detectó menos pacientes positivos para HACA que el ensayo de cambio de movilidad, y más falsos negativos, así como más falsos positivos.

Tabla 4. Correlación entre los niveles relativos de HACA en suero de paciente de muestras fuertemente positivas y negativas en ensayo de puente y ensayo de HPLC-ET

	Ensayo de puente	Ensayo HPLC de desplazamiento	Correlación
Positivas	82	81	99%
Negativas	12	12	100%

Tabla 5. Análisis de muestras de paciente, de niveles séricos de HACA utilizando el ensayo de puente (valor de corte: 1,69 µg/ml) y ensayo HPLC de desplazamiento (valor de corte: 0,19, proporción entre IFX unido y libre).

	Sujetos (n)	HACA-positivo		Ensayo de puente	
		Ensayo de puente	Ensayo de HPLC	Falsos negativos	Falsos positivos
Control sano	50	N/A	0	N/A	N/A
Paciente tratado con IFX	117	24 (20.5%)	33 (28.2%)	9 (IFX elevado)	9

Los resultados falsos negativos están causados por suero de paciente que contiene niveles elevados de IFX que interfiere con el ensayo de puente sobre la determinación de HACA, mientras que en el ensayo de HPLC-ET no resulta afectado. Los resultados falsos positivos están causados por suero de paciente que contiene niveles elevados de sustancia de interferencia no específica que podría interferir con el ensayo de puente.

La figura 15 muestra la relación entre el nivel de HACA y la concentración de IFX sobre pacientes de EII durante el curso del tratamiento con IFX. Pudo detectarse HACA incluso en V10 (30 semanas) y continuó incrementándose en algunos pacientes durante el tratamiento de IFX. La figura 16 muestra que puede detectarse HACA en presencia de IFX utilizando el ensayo. Un nivel más alto de HACA en el suero estaba asociado a un nivel más bajo de IFX que pudo detectarse (por ejemplo redujo la biodisponibilidad). De esta manera, la detección precoz de HACA durante el tratamiento con IFX podría guiar al médico y/o al paciente en el cambio a otros fármacos anti-TNF o a incrementar la dosis de IFX.

Los ensayos se validaron en términos de precisión intraensayo e interensayo (basándose en el parámetro CV) y la susceptibilidad a los agentes de interferencia. Se presenta este análisis a continuación:

Ensayo de infliximab		Ensayo de HACA	
Parámetro	CV%	Parámetro	CV%
Precisión intraensayo	2,89	Precisión intraensayo	3,96
Precisión interensayo		Precisión interensayo	
Entre análisis	4,57	Entre análisis	4,15
Entre analistas	6,06	Entre analistas	5,84
Entre instrumentos	2,73	Entre instrumentos	6,88

Ensayo de infliximab			
Agente de interferencia	Intervalo típico	Concentración sometida a ensayo	Interferencia
IgG., IgA, IgM	0,4-16 mg/ml	10, 2,0, 1,5 mg/ml	NA
ATI	3,71-150 U/ml (0-60 µg/ml)	100 U/ml (- 55 µg/ml)	Interfiere con la detección de muestras con baja concentración de FIX (<5 µg/ml)
Factor reumatoide	>30 IU/ml (pacientes positivos para AR)	Up to 387 IU/ml	NA
TNF-α	6,2-6,6 pg/ml	0,0125 ng/ml-40 µg/ml	100 ng/ml
TNFR1/TNFR2	1,9/4,5 ng/ml	0,1-1.000 ng/ml	NA
Suero hemolizado	>20 HI	100-300 HI	NA
También se sometieron a ensayo los agentes siguientes y no mostraron interferencia: Azatioprina, metotrexato, TNF-β, suero lipémico, hemoglobina			

Ensayo de HACA			
Agente de interferencia	Intervalo típico	Concentración sometida a ensayo	Interferencia
IgG, IgA, IgM	0,4-16 mg/ml	10, 2,0, 1,5 mg/ml	NA
Infliximab	0-100 mg/ml	0,78-100 µg/ml	NA
Factor reumatoide	>30 IU/ml (pacientes positivos para AR)	Hasta 774 IU/ml	NA
TNF-α	6,2-6,6 pg/ml	0,0125 ng/ml-40 µg/ml	250 ng/ml
TNFR1/TNFR2	1,9/4,5 ng/ml	0,1-1000 ng/ml	NA
Suero hemolizado	>20 HI	100-300 HI	NA
También se sometieron a ensayo los agentes siguientes y no mostraron interferencia: Azatioprina, metotrexato, TNF-β, suero lipémico, hemoglobina			

CONCLUSIONES

5 Los fármacos biológicos anti-TNF-α pueden marcarse fácilmente con un fluoróforo ("FI") y el formato de ensayo de cambio de movilidad 5 utilizado para medir HACA/HAHA es un ensayo homogéneo sin el recubrimiento de antígenos en una superficie sólida y las múltiples etapas de lavado e incubación de un ELISA típico. La incubación de IFX marcado con IFX en suero positivo para HACA resulta en la formación de un complejo inmunológico que eluye en una posición diferente de IFX marcado con FI libre en la HPLC-ET y, de esta manera, puede cuantificarse la cantidad de HACA. La presencia de otros componentes del suero presenta pocos efectos sobre el ensayo de cambio de movilidad. El formato de ensayo de cambio de movilidad, al contrario que el ELISA, no resulta afectado por la unión no específica de IgG no relevantes y detecta el isotipo IgG4. Las muestras de suero sano no provocan cambio de movilidad de IFX marcado con FI y 28,2% de los pacientes tratados con IFX se encontró que presentaban HACA en el ensayo. De esta manera, el formato de ensayo descrito en la presente memoria es muy sensible y puede aplicarse a la detección de todos los fármacos biológicos (por ejemplo Remicade, Humira, Enbrel y Cimzia), así como sus anticuerpos (por ejemplo anti-Remicade, anti-Humira, anti-Enbrel y anti-Cimzia) en el suero del paciente. Resulta notable que, ya que HACA puede detectarse en presencia de IFX utilizando el ensayo de cambio de movilidad, la detección precoz de HACA durante el tratamiento con IFX podría guiar al médico y/o al paciente en el cambio a otros fármacos anti-TNF o a incrementar la dosis posterior de IFX.

10 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo ensayo de HPLC-ET sin marcaje radioactivo y en fase líquida, para medir los niveles de IFX y HACA en muestras de suero procedentes de pacientes tratados con IFX. El nuevo ensayo presenta elevadas sensibilidad, exactitud y precisión, y los resultados son altamente reproducibles, lo que hace que este ensayo resulte adecuado para el ensayo rutinario de un gran número de muestras de suero humano. El nuevo formato de ensayo, al contrario que el ELISA, elimina el recubrimiento con antígenos de la superficie sólida y no resulta afectado por la unión no específica de IgG no relevantes. Estas ventajas del formato de ensayo descrito en la presente memoria reducen los resultados falsos negativos y falsos positivos del ensayo. Ventajosamente, el formato de ensayo es muy sensible y puede utilizarse para detectar todos los fármacos biológicos, así como sus anticuerpos, presentes en el suero mientras el paciente se encuentra bajo terapia.

25 Ejemplo 4. Diferenciación entre anticuerpos antiquméricos humanos (HACA) neutralizadores y no neutralizadores en suero de paciente utilizando nuevos ensayos de cambio de movilidad.

30 El presente ejemplo ilustra nuevos ensayos homogéneos para medir las concentraciones de autoanticuerpos (por ejemplo HACA) en una muestra de paciente (por ejemplo de suero) y para determinar si dichos autoanticuerpos son

autoanticuerpos neutralizadores o no neutralizadores utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño para detectar la unión de estos autoanticuerpos a fármaco anti-TNF- α marcado fluorescentemente en presencia de TNF- α marcado fluorescentemente. Estos ensayos resultan ventajosos porque evitan la necesidad de etapas de lavado, las cuales eliminan HACA de baja afinidad, utilizan fluoróforos diferentes que permiten la detección en los espectros visible y/o de IR que reducen el fondo y los problemas de interferencia con el suero, incrementa la capacidad de detectar HACA neutralizador o no neutralizador en pacientes con un título bajo debido a la elevada sensibilidad de la detección con marcaje fluorescente y se produce como una reacción en fase líquida, reduciendo de esta manera la probabilidad de cualesquiera cambios en el epítipo por unión a una superficie sólida, tal como una placa de ELISA.

En un método ejemplar, se marca un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo REMICADETM) con un fluoróforo "F1" (ver, por ejemplo, la figura 17A), en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como de IR. De manera similar, se marca TNF- α con un fluoróforo "F2" (ver, por ejemplo, la figura 17A), en el que el fluoróforo también puede detectarse en espectros visibles o de IR, o en ambos, y en el que "F1" y "F2" son fluoróforos diferentes. El fármaco anti-TNF- α marcado se incuba con suero humano en una reacción en fase líquida y el TNF- α marcado se añade a la reacción para permitir la formación de complejos (es decir, complejos inmunológicos) entre el fármaco anti-TNF- α marcado, TNF- α marcado y/o HACA presente en el suero. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión de tanto el autoanticuerpo (por ejemplo HACA) y TNF- α marcado al fármaco anti-TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico (por ejemplo el "complejo inmunológico 1" en la figura 17A) en comparación con un complejo binario entre el autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α marcado (por ejemplo el "complejo inmunológico 2" en la figura 17A), el fármaco marcado solo o TNF- α marcado solo. La presencia de este complejo ternario de autoanticuerpo (por ejemplo HACA), TNF- α marcado y fármaco anti-TNF- α marcado, indica que el autoanticuerpo presente en la muestra de suero es una forma no neutralizadora del autoanticuerpo (por ejemplo HACA), de manera que el autoanticuerpo no interfiere con la unión entre el anticuerpo anti-TNF- α y TNF- α . En un método particular, tal como se muestra en la figura 17A, en caso de encontrarse presente HACA no neutralizador en el suero, se observará un desplazamiento tanto de F1-REMICADETM como de F2-TNF- α , resultando en un incremento en los picos de tanto el complejo inmunológico 1 como el complejo inmunológico 2, y en una reducción de los picos de F1-REMICADETM libre y de F2-TNF- α libre. Sin embargo, la presencia del complejo binario entre el autoanticuerpo (por ejemplo HACA) y el fármaco anti-TNF- α marcado (por ejemplo el "complejo inmunológico 2" en la figura 17B) en ausencia del complejo ternario de autoanticuerpo (por ejemplo HACA), TNF- α marcado y fármaco anti-TNF- α marcado indica que el autoanticuerpo presente en la muestra de suero es una forma neutralizadora del autoanticuerpo (por ejemplo HACA), de manera que el autoanticuerpo interfiere con la unión entre el anticuerpo anti-TNF- α y TNF- α . En un método particular, tal como se muestra en la figura 17B, en caso de encontrarse presente HACA neutralizador en el suero, se observará un desplazamiento de F1-REMICADETM resultando en un incremento del complejo inmunológico 2, y en una reducción de los picos de F1-REMICADETM libre y en ningún cambio en el pico de F2-TNF- α libre. En determinados casos, la presencia de HACA neutralizador indica que la terapia actual con REMICADETM debería cambiarse a otro fármaco anti-TNF- α , tal como HUMIRATM.

En un método alternativo, el fármaco anti-TNF- α marcado en primer lugar se incuba con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir la formación de complejos (es decir, complejos inmunológicos) entre el fármaco anti-TNF- α marcado y HACA presente en el suero. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una primera columna de exclusión por tamaño. La unión del autoanticuerpo (por ejemplo HACA) al fármaco anti-TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico (por ejemplo el "complejo inmunológico 2" en la figura 18) en comparación con fármaco marcado solo. A continuación se añade TNF- α marcado a la reacción para determinar si es capaz de desplazar (por ejemplo competir con) el autoanticuerpo (por ejemplo HACA) para la unión al fármaco anti-TNF- α marcado, permitiendo de esta manera la formación de complejos (es decir, complejos inmunológicos) entre el fármaco anti-TNF- α marcado y TNF- α marcado. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una segunda columna de exclusión por tamaño. La unión del fármaco anti-TNF- α marcado a TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico (por ejemplo el "complejo inmunológico 3" en la figura 18) en comparación con TNF- α marcado solo. La alteración de la unión entre el autoanticuerpo (por ejemplo HACA) y el fármaco anti-TNF- α marcado mediante la adición de TNF- α marcado indica que el autoanticuerpo presente en la muestra de suero es una forma neutralizadora del autoanticuerpo (por ejemplo HACA), de manera que el autoanticuerpo interfiere con la unión entre el anticuerpo anti-TNF- α y TNF- α . En determinados casos, la presencia de HACA neutralizador indica que la terapia actual con REMICADETM debería cambiarse a otro fármaco anti-TNF- α , tal como HUMIRATM.

Ejemplo 5. Análisis de anticuerpos antifármaco (AAF) humanos contra adalimumab en suero de paciente utilizando un nuevo ensayo homogéneo de cambio de movilidad.

Antecedentes y objetivo: se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales contra TNF- α tales como infliximab (IFX), adalimumab (HUMIRATM) y certolizumab resultan eficaces en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y otros trastornos inflamatorios. Los anticuerpos antifármaco (AAF) podrían reducir la eficacia del fármaco y/o inducir efectos adversos. Sin embargo, se han encontrado AAF no sólo en pacientes tratados con el

anticuerpo quimérico infliximab, sino también en pacientes tratados con el anticuerpo humanizado adalimumab. El seguimiento de los niveles de AAF y de fármaco en pacientes individuales podría ayudar a optimizar el tratamiento y la administración en el paciente. Los presentes inventores han desarrollado un ensayo homogéneo de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo en fase líquida para medir con exactitud en el suero tanto HACA (anticuerpo antiquimérico humano) como IFX en los pacientes. Dicho método de ensayo supera una limitación importante de los actuales ensayos en fase sólida para la detección de HACA: la incapacidad para detectar con exactitud HACA en presencia de IFX en circulación. En el presente estudio, los presentes inventores han evaluado dicho nuevo método para medir los niveles séricos de AAF y de fármaco en pacientes tratados con el fármaco de anticuerpo humanizado, adalimumab.

Métodos: el ensayo de cambio de movilidad se basó en el cambio del tiempo de retención de un antígeno libre frente a un complejo inmunológico de antígeno-anticuerpo sobre la separación de exclusión por tamaño. Se mezcló adalimumab marcado con fluoróforo o TNF- α y control interno con muestras de suero con el fin de medir el cambio de movilidad del adalimumab libre y TNF- α en presencia de AAF o fármaco. Los cambios en la proporción de adalimumab libre o TNF- α y control interno son indicadores de la formación de complejo inmunológico. Se determinaron las concentraciones séricas de AAF o adalimumab con curvas estándares generadas mediante la incubación con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-IgG humano o adalimumab purificado. Mediante la utilización del ensayo de cambio de movilidad, los presentes inventores midieron los niveles de adalimumab y de AAF en sueros recogidos de pacientes de EII tratados con adalimumab que ya no respondían.

Resultados: se generaron curvas de dosis-respuesta con anticuerpo anti-IgG humano para la medición del cambio de movilidad del adalimumab marcado. El límite de detección del ensayo era de 1 ng de anti-IgG humano. Se sometieron a ensayo los sueros de cincuenta controles sanos para AAF y todas las muestras presentaban niveles de AAF inferiores al límite de detección (es decir, sin cambio del adalimumab marcado libre). También se demostró la detección de AAF en presencia de adalimumab añadido exógenamente. Para medir la concentración de fármaco en pacientes tratados con adalimumab, los presentes inventores generaron una curva estándar con diferentes cantidades de adalimumab respecto al cambio de movilidad de TNF- α marcado y el límite de detección del adalimumab era de 10 ng.

Conclusiones: el ensayo homogéneo de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo en fase líquida del presente método se aplicó a la medición de los niveles de AAF y adalimumab en muestras de suero de pacientes tratados con adalimumab. Se encontró que el ensayo era reproducible y de alta sensibilidad y exactitud, y que podía utilizarse para evaluar los niveles de AAF en muestras de suero de pacientes tratados con adalimumab.

Ejemplo 6. Análisis de anticuerpos antifármaco (AAF) contra adalimumab en suero de paciente utilizando un nuevo ensayo propietario de cambio de movilidad.

RESUMEN

Antecedentes: se ha demostrado que los fármacos anti-TNF- α tales como el infliximab (IFX) y el adalimumab (ADL) resultan eficaces en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). Sin embargo, la inducción de AAF en los pacientes tratados podría reducir la eficacia del fármaco y/o inducir efectos adversos. En efecto, se han encontrado AAF no sólo en pacientes tratados con IFX, sino también en pacientes tratados con ADL. El seguimiento de los niveles de AAF y de fármaco en pacientes individuales podría ayudar a optimizar el tratamiento y la administración en el paciente. Los presentes inventores han desarrollado un ensayo propietario de cambio de movilidad para medir con exactitud en el suero tanto HACA (anticuerpo antiquimérico humano) como IFX en pacientes tratados con IFX. Dicho ensayo supera una limitación importante de los actuales ensayos en fase sólida para la detección de HACA: la incapacidad para detectar con exactitud HACA en presencia de IFX en circulación. En el presente estudio, los presentes inventores han evaluado dicho nuevo ensayo para medir los niveles séricos de AAF y de fármaco en pacientes tratados con el fármaco de anticuerpo totalmente humano ADL.

Métodos: el ensayo de cambio de movilidad se basó en el cambio del tiempo de retención de un complejo inmunológico de antígeno-anticuerpo frente a antígeno libre en la cromatografía de exclusión por tamaño. Se mezcló ADL o TNF- α marcado con fluoróforo y control interno con muestras de suero con el fin de medir el cambio de movilidad de ADL y TNF- α marcados, en presencia de AAF o fármaco. Los cambios en la proporción de ADL libre o TNF- α y control interno son indicadores de la formación de complejo inmunológico. Se determinaron las concentraciones séricas de ADA o ADL con curvas estándares generadas mediante la incubación con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-IgG humano o ADL purificado. Utilizando este ensayo los presentes inventores midieron los niveles de ADL y AAF en sueros recogidos de pacientes de EII tratados con ADL.

Resultados: se generaron curvas de dosis-respuesta con anticuerpo anti-IgG humano para la medición del cambio de movilidad del ADL marcado. El límite de detección del ensayo era de 10 ng de anti-IgG humano. Se sometieron a ensayo 100 controles sanos para AAF y todas las muestras presentaban niveles de AAF inferiores al límite de

detección (es decir, sin cambio de ADL marcado libre). Se demostró la detección de AAF en cinco de 114 muestras de pacientes de EII tratados con ADL. Para medir la concentración de fármaco en pacientes tratados con ADL, los presentes inventores generaron una curva estándar con diferentes cantidades de ADL respecto al cambio del TNF- α marcado, con un límite de detección de 10 ng.

Conclusiones: los presentes inventores aplicaron su ensayo propietario de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo en fase líquida para medir los niveles de AAF y ADL en suero de pacientes tratados con ADL. Los ensayos eran reproducibles y de alta sensibilidad y exactitud, y resultan útiles para evaluar los niveles de AAF en muestras de suero de pacientes tratados con ADL.

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los fármacos biológicos anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) tales como el infliximab (IFX), el etanercept, el adalimumab (ADL) y el certolizumab pegol reducen la actividad de la enfermedad en varias enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la enfermedad de Crohn (EC) y la artritis reumatoide (AR). Sin embargo, algunos pacientes no responden a la terapia anti-TNF- α , mientras que otros requieren una dosificación más alta o más frecuente debido a la falta de respuesta suficiente, o el desarrollo de reacciones a la infusión.

La inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos que causa que los pacientes desarrollen anticuerpos contra los fármacos podría contribuir al fracaso de los tratamientos y de las reacciones a la infusión. Algunos anticuerpos quiméricos como IFX presentan un potencial más alto de inducir la generación de anticuerpos en comparación con anticuerpos totalmente humanizados como el ADL. La prevalencia de anticuerpos contra IFX (HACA) en pacientes de AR varía entre 12% y 44% y aparentemente es inversamente proporcional al nivel de IFX en suero de paciente y la respuesta terapéutica. Aunque el ADL totalmente humanizado se supone que es menos inmunogénico que los anticuerpos murinos o quiméricos, varios estudios han informado de la formación de anticuerpos humanos antihumanizados (HAHA) y han demostrado la prevalencia de la generación de anticuerpos de 1% a 87% en pacientes de AR y EC (Aikawa *et al.*, Immunogenicity of Anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. Clin. Rev. Allergy Immunol. 38(2-3):82-9, 2010).

Muchos pacientes con fracaso de respuesta secundario a un fármaco anti-TNF- α podrían beneficiarse del cambio a otro fármaco anti-TNF- α o del incremento de la dosificación y/o de la frecuencia de dosificación. Por lo tanto, se justifica el seguimiento de los pacientes para los niveles de fármaco y de anticuerpo antifármaco (AAF) de manera que la administración de fármaco puede personalizarse a cada paciente individual. Este enfoque permite ajustar las dosis cuando esté justificado o el cese de la medicación en caso de detectar niveles de AAF (Bendtsen *et al.*, Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. Scand. J. Gastroenterol. 44(7):774-81, 2009; Afif *et al.*, Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol., 105(5):1133-9, 2010).

Se han desarrollado varios ensayos para medir HACA y HAHA. Una de las limitaciones de las actuales metodologías es que los niveles de AAF no pueden medirse fiablemente cuando hay un nivel elevado de fármacos en la circulación.

Los presentes inventores han desarrollado un ensayo propietario de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo en fase líquida para medir los niveles de AAF y de ADL en suero de pacientes tratados con ADL que no resulta afectado por la presencia del fármaco en el suero.

MÉTODOS

Se incubó ADL marcado con fluoróforo (FI) con suero de paciente para formar el complejo inmunológico. Se incluyó un péptido pequeño marcado con FI a modo de control interno en cada reacción. Se utilizaron cantidades diferentes de anticuerpo anti-IgG humano para generar una curva estándar con el fin de determinar el nivel sérico de AAF. Se separó el ADL marcado con FI del complejo unido a anticuerpo basándose en su peso molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se utilizó la proporción de ADL marcado con FI libre y control interno de cada muestra para extrapolar la concentración de HAHA a partir de la curva estándar. Se utilizó una metodología similar para medir los niveles de ADL en muestras de suero de paciente con TNF- α marcado con FI.

RESULTADOS:

La figura 19 muestra la separación del complejo de FI-ADL unido a anticuerpo anti-IgG humano respecto de FI-ADL libre debido al cambio de movilidad del complejo de alto peso molecular. Tal como puede observarse en los paneles c a h, el tiempo de retención del pico fluorescente se desplazó de 10,1 min. a 7,3-9,5 min. A mayor cantidad

presente de anticuerpo anti-IgG humano en la mezcla de reacción, queda menos ADL libre en el cromatograma y se forma más complejo inmunológico (h a c). El tiempo de retención para el control interno era de 13,5 min.

La figura 20 muestra la curva de dosis-respuesta del cambio del pico fluorescente causado por la adición de anti-IgG humano. El incremento de la concentración de anticuerpo anti-IgG humano reduce la proporción entre ADL libre y control interno debido a la formación del complejo inmunológico. La sensibilidad del ensayo era de 10 ng/ml de anticuerpo anti-IgG humano. El control interno "FI-BioCyt" corresponde a Alexa Fluor® 488-biotina (BioCyt), que combina el fluoróforo verde fluorescente Alexa Fluor® 488 con biotina y una amina primaria fixable por aldehído (lisina) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

La figura 21 muestra la separación del complejo de TNF- α -FI unido a ADL respecto de TNF- α -FI libre debido al cambio de movilidad del complejo de alto peso molecular. Tal como puede observarse en los paneles c y j, el tiempo de retención del pico fluorescente se desplazó de 11,9 min. a 6,5-10,5 min. A mayor cantidad presente de HACA en la mezcla de reacción, queda menos TNF-Alexa libre en el cromatograma y se forma más complejo inmunológico.

La figura 22 muestra las curvas de dosis-respuesta del cambio del pico de TNF- α -FI causado por la adición de ADL. Basándose en el ADL añadido, el límite de detección es 10 ng/ml de ADL en el suero.

La Tabla 6 demuestra que las muestras de suero de 100 sujetos sanos y 114 pacientes de EII tratados con ADL fueron analizadas para los niveles de AAF y ADL utilizando el ensayo de cambio de movilidad. La totalidad de las muestras de 100 sujetos sanos presentaba niveles de AAF inferiores al límite de detección (sin cambio de FI-ADL libre), mientras que 5 de 114 muestras de paciente presentaba una concentración de AAF de 0,012 a >20 μ g/ml. El promedio de los niveles de ADL en muestras de 100 sujetos sanos fue de 0,76 \pm 1,0 μ g/ml (intervalo de 0 a 9,4 μ g/ml). El promedio de los niveles de ADL en 114 muestras de suero de pacientes tratados con EII fue de 10,8 \pm 17,8 μ g/ml (intervalo de 0 a 139 μ g/ml). Cuatro de cada cinco muestras positivas para AAF presentaba niveles indetectables de ADL.

Tabla 6. Niveles en suero de paciente de AAF y ADL medidos mediante el ensayo de cambio de movilidad

	Sujetos (n)	Sexo (V/M)	Edad (años) (promedio)	Positivo para AAF	Nivel de ADL (μ g/ml)
Control sano	100	38/62	18-62 (37,1)	0	0,76 \pm 1,00
Paciente de EII tratado con ADL	114	51/63	20-69 (39,9)	5(4,3%)	10,80 \pm 17,80

CONCLUSIONES

El formato de ensayo de cambio de movilidad utilizado para medir HACA/IFX es un ensayo homogéneo sin el recubrimiento con antígenos de una superficie sólida, y sin las múltiples etapas de lavado e incubación de un ELISA típico. Este ensayo puede aplicarse a la medición de fármacos AAF y anti-TNF. La sensibilidad del ensayo (intervalo de μ g/ml) es superior para la medición de tanto AAF como ADL en suero de paciente que utilizando métodos de ELISA (intervalo de μ g/ml). Las muestras de suero de control sano no provocaron cambio de movilidad de ADL marcado con FI y 4,3% de los pacientes tratados con ADL se encontró que presentaban AAF en el ensayo. Aunque las muestras de suero de control sano causaron un cambio de movilidad de TNF- α marcado con FI, que podría haberse debido a la presencia de receptor libre soluble de TNF- α , la media de ADL en los pacientes tratados con ADL era mucho más alta (10,8 frente a 0,76 mg/ml). La detección precoz de AAF y el seguimiento del nivel de fármaco ADL mientras el paciente recibe tratamiento de ADL permitirá al médico optimizar la dosificación de ADL o cambiar a otro fármaco anti-TNF- α en caso apropiado para, de esta manera, optimizar el control global de la enfermedad del paciente.

Tabla 7. Niveles en suero de paciente de AAF y ADL medidos mediante el ensayo de cambio de movilidad

	Sujetos (n)	Sexo (V/M)	Edad (promedio)	Nivel de ADL (μ g/ml)	Positivo para AAF
Control sano	100	38/62	18-62 (37,1)	0,76 \pm 1,00	0
Paciente de EII tratado con ADL	114	51/63	20-69 (39,9)	10,80 \pm 17,80	0-4 μ g/ml ADL: 4 de 42 (9,52%)

Utilizando el presente ensayo de cambio de movilidad los presentes inventores analizaron muestras de suero procedentes de 100 sujetos sanos y 114 pacientes de EII tratados con ADL para los niveles de AAF y ADL. La totalidad de las muestras de los 100 sujetos sanos presentaba niveles de AAF inferiores al límite de detección (sin cambio de FI-ADL libre), mientras que 4 de 42 muestras de paciente con 0 a 4 μ g/ml de ADL presentaba una concentración media de AAF de 0,012 a >20 μ g/ml. El promedio de los niveles de ADL en las muestras de 100 sujetos sanos fue de 0,76 \pm 1,0 μ g/ml (intervalo de 0 a 9,4 μ g/ml). El promedio de los niveles de ADL en 114 muestras de suero de pacientes tratados con ADL fue de 10,8 \pm 17,8 μ g/ml (intervalo de 0 a 139 μ g/ml). Cuatro

de cada cuatro muestras positivas para AAF presentaba niveles indetectables de ADL. Para la detección de AAF, los 114 pacientes de EII tratados con ADL fueron divididos en dos categorías: 0 a 4 µg/ml de ADL y >4 µg/ml de ADL. Los pacientes con más de 4 µg/ml de ADL se sometieron a ensayo con una cantidad mayor de ADL-FI para contrarrestar la competición de ADL circulante con ADL-FI.

Las muestras de suero de control sano no causaron un cambio de movilidad del ADL marcado con FI. En un estudio preliminar, se encontró que el 9,52% de los pacientes con 0,4 µg/ml de ADL presentaba AAF en el presente ensayo.

5 Ejemplo 7: determinación de los niveles de concentración de REMICADE™ y anticuerpos antifármaco humanos

El presente ejemplo describe un método para determinar los niveles de fármacos anti-TNF-α, por ejemplo de REMICADEM™ (Infliximab) en una muestra de suero, así como para determinar los niveles de un anticuerpo antifármaco humano, por ejemplo un anticuerpo antiquímérico humano (HACA) contra REMICADE™ (Infliximab).

10

Etapa 1: determinación del nivel de concentración de REMICADE™ (infliximab) en una muestra.

15

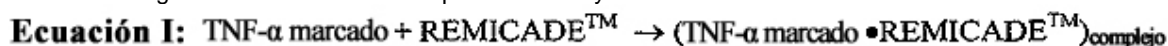
TNF-α puede marcarse con un fluoróforo (por ejemplo Alexa₆₄₇), en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como de IR, o en ambos. El TNF-α marcado se incuba con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir que se una el fármaco anti-TNF-α presente en el suero. El TNF-α marcado también puede incubarse con cantidades conocidas del fármaco anti-TNF-α en una reacción en fase líquida para generar una curva estándar. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión del fármaco anti-TNF-α a TNF-α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico en comparación con TNF-α marcado solo. La concentración del fármaco anti-TNF-α presente en la muestra de suero seguidamente puede compararse con la curva estándar y los controles.

20

Análisis de HPLC-ET de los niveles de REMICADE™ (infliximab) en el suero del paciente. Se marcó TNF-α recombinante humano con un fluoróforo (Alexa Fluor® 488) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó TNF-α marcado con diferentes cantidades de REMICADE™ o suero de paciente durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron muestras de 100 µl mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC. Se utilizó la detección de marcaje fluorescente para realizar el seguimiento del TNF-α marcado libre y el complejo inmunológico de TNF-α unido basándose en sus tiempos de retención. Se calcularon los niveles de REMICADE™ a partir de la curva estándar.

25

30 Las ecuaciones siguientes son relevantes al presente ensayo:



$$\text{Ecuación II: } [\text{REMICADE}^{\text{TM}}]_{\text{sin TNF-}\alpha \text{ marcado presente}} = [(\text{TNF-}\alpha \text{ marcado} \bullet \text{REMICADE}^{\text{TM}})_{\text{complejo}}]$$

$$\text{Ecuación III: } [\text{REMICADE}^{\text{TM}}] = [(\text{TNF-}\alpha \text{ marcado} \bullet \text{REMICADE}^{\text{TM}})_{\text{complejo}}] / [(\text{TNF-}\alpha \text{ marcado})] \times [(\text{TNF-}\alpha \text{ marcado})]$$

35

En la Etapa 1, se pone en contacto una cantidad conocida de TNF-α marcado con una muestra de suero que contiene REMICADE™. El TNF-α marcado y REMICADE™ forman un complejo (TNF-α marcado•REMICADE™)_{complejo}, ver la Ecuación I. Debido a que la totalidad del REMICADE™ formará un complejo con TNF-α marcado, la concentración de REMICADE™ presente antes de la introducción de TNF-α marcado es igual a la concentración medida de TNF-α marcado•REMI-CADE™_{complejo}, ver la Ecuación II. El nivel de concentración de REMICADE™ se calculó multiplicando la proporción entre [(TNF-α marcado•REMICADE™)_{complejo}]/[TNF-α marcado] y [TNF-α marcado], ver la Ecuación III. La proporción [(TNF-α marcado•REMI-CADE™)_{complejo}]/[TNF-α marcado] se obtuvo integrando el área bajo la curva para el pico de (TNF-α marcado•REMI-CADE™)_{complejo}, a partir de un gráfico de intensidad de la señal como función del tiempo de elución del HPLC de exclusión por tamaño, y dividiendo este número por la integración resultante del área bajo la curva para el pico de TNF-α marcado del gráfico. La [TNF-α marcado] es conocida *a priori*.

45

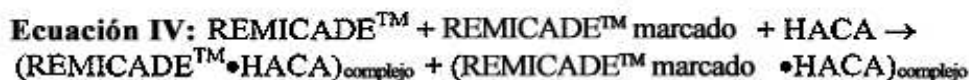
Etapa 2: determinación del nivel de anticuerpo antiquímérico humano, HACA.

El fármaco anti-TNF- α (por ejemplo REMICADE™) puede marcarse con un fluoróforo, por ejemplo Alexa₆₄₇, en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como fluorescente. El fármaco anti-TNF- α marcado se incubaba con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir que se una cualquier HACA presente en el suero. El fármaco anti-TNF- α marcado también puede incubarse con cantidades conocidas del anticuerpo anti-IgG o suero de paciente positivo agrupado en una reacción en fase líquida para generar una curva estándar. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión de los autoanticuerpos a fármaco anti-TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico en comparación con fármaco marcado solo. La concentración de HACA presente en la muestra de suero seguidamente puede compararse con la curva estándar y los controles.

Análisis de HPLC-ET de los niveles de HACA en el suero del paciente. Se marcó REMICADE™ purificado con un fluoróforo. Se incubó REMICADE™ marcado con diferentes diluciones de suero agrupado positivo para HACA o suero de paciente diluido durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron muestras de 100 μ l mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC. Se utilizó la detección de marcaje fluorescente para realizar el seguimiento de REMICADE™ marcado libre y el complejo inmunológico de REMICADE™ marcado unido, basándose en sus tiempos de retención. Se utilizó la proporción entre REMICADE™ unido a libre para determinar el nivel de HACA tal como se indica posteriormente.

Procedimiento de ensayo de cambio de movilidad para medir HACA en suero. El principio de este ensayo se basa en el cambio de movilidad del anticuerpo antifármaco, por ejemplo HACA, con REMICADE™ marcado con Alexa₆₄₇ frente a REMICADE™ marcado con Alexa₆₄₇ pero libre en cromatografía líquida de alto rendimiento-exclusión por tamaño (HPLC-ET) debido al incremento del peso molecular del complejo. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de HPLC Agilent-1200 utilizando una columna Bio-Sep de 300x7,8 mm SEC-3000 (Phenomenex) con un intervalo de fraccionamiento de pesos moleculares de 5.000 a 700.000 y una fase móvil de 1X PBS, pH 7,3, a un caudal de 0,5 a 1,0 ml/min con detección de marcaje fluorescente, por ejemplo la detección de UV a 650 nm. Enfrente del sistema de HPLC Agilent-1200 con una columna Bio-Sep de 300x7,8 mm SEC-3000 se encontraba un precolumna analítica BioSep de 75x7,8 mm SEC-3000. Se cargó un volumen de muestra de 100 μ l en la columna para cada análisis. El complejo de HACA y complejo de REMICADE™ marcado se formó mediante la incubación de suero procedente de un paciente tratado con REMICADE™ y REMICADE™ marcado en el tampón de elución 1X PBS, pH 7,3, a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis de HPLC-ET.

Las ecuaciones siguientes son relevantes al presente ensayo:



$$\text{Ecuación V: } \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}} = \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado}]}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}}$$

$$\text{Ecuación VI: } [\text{HACA}] = [\text{REMICADE}^{\text{TM}} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}} + [\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}$$

$$\text{Ecuación VII: } \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}} = \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado}]}$$

$$\text{Ecuación VIII: } \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado}]} = \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado}]}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \text{ marcado}]} \times \frac{[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \bullet \text{HACA}]_{\text{complejo}}}{[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]}$$

$$\text{Ecuación IX: } [\text{REMICADE}^{\text{TM}}]_{\text{cantidad eficaz}} = [\text{REMICADE}^{\text{TM}}] - [\text{HACA}]$$

Determinación de los niveles de concentración de anticuerpos humanos anti-fármaco de TNF- α , por ejemplo HACA. Se añadió una concentración conocida de REMICADETM marcado a una muestra de suero. HACA forma un complejo con REMICADETM o REMICADETM marcado. Ver la Ecuación IV. Se determinó la [REMICADETM] en la Etapa 1, anteriormente. Mediante la integración del área bajo la curva para REMICADETM marcado•HACA_{complejo} y dividiendo este número por la integración resultante del área bajo la curva para REMICADETM marcado libre, se obtuvo la proporción entre [REMICADETM marcado•HACA_{complejo}] y [REMICADETM marcado]. La proporción entre [REMICADETM] y [REMICADETM•HACA_{complejo}] es igual a la proporción entre [REMICADETM marcado] y [REMICADETM marcado•HACA_{complejo}], ver la Ecuación V. Debido a que HACA se equilibra y forma un complejo tanto con REMICADETM como REMICADETM marcado, la cantidad total de HACA es igual a la suma de la cantidad de REMICADETM•HACA_{complejo} y la cantidad de REMICADETM marcado•HACA_{complejo}, ver la Ecuación VI. Debido a que la proporción entre [REMICADETM] y [REMICADETM•HACA_{complejo}] es igual a la proporción entre [REMICADETM marcado] y [REMICADETM marcado•HACA_{complejo}], tanto [REMICADETM-HACA]_{complejo} como [REMICADETM marcado-HACA_{complejo}] se determinan mediante la multiplicación de la proporción entre [REMICADETM marcado•HACA_{complejo}]/[REMICADETM marcado] por, respectivamente, la concentración de REMICADETM, determinada en la Etapa 1, y la concentración de REMICADETM marcado, conocida *a priori*. Ver las Ecuaciones VII y VIII. Por lo tanto, la cantidad total de HACA es igual a la suma de (1) [REMICADETM], de la etapa 1, multiplicado por [REMICADETM marcado•HACA]_{complejo}/[REMICADETM marcado], y (2) [REMICADETM marcado], conocida *a priori*, multiplicado por [REMICADETM marcado•HACA]_{complejo}/[REMICADETM marcado].

Determinación de los niveles de concentración eficaces de REMICADETM. Debido a que HACA se acompleja con REMICADETM, la cantidad eficaz de REMICADETM disponible en una muestra de suero es la cantidad de REMICADETM, medida en la Etapa 1, menos la cantidad de HACA, medida en la Etapa 2, ver la Ecuación IX.

Cálculo ejemplar. En el paciente JAG en V10, se determinó que la [REMICADETM] era de 7,5 $\mu\text{g/ml}$. Ver la figura 16c. Este resultado se obtuvo siguiendo la Etapa 1 y utilizando las Ecuaciones I a III. 7,5 $\mu\text{g/ml}$ es igual a 30 ng/4 μl . Debido a que se utilizaron 4 μl de muestra en la medición en la Etapa 2, se encontraba presente un total de 30,0 ng de REMICADETM en la muestra analizada. La proporción [REMICADETM marcado•HACA]_{comp}/[REMICADETM marcado] para el paciente JAG en V10 era de 0,25, ver la figura 16b. La [REMICADETM marcado] introducida en la muestra fue de 37,5 ng/100 μl . Debido a que se utilizaron 100 μl de REMICADETM marcado en la medición en la Etapa 2, se encontraba presente un total de 37,5 ng de REMICADETM marcado en la muestra analizada. Utilizando la Ecuación VII, la cantidad total de REMICADETM•HACA_{complejo} era de 30 ng multiplicada por 0,25, que equivale a 7,5 ng de REMICADETM marcado•HACA_{complejo}. Utilizando la Ecuación VIII, la cantidad total de REMICADETM marcado•HACA_{complejo} era de 37,5 ng multiplicada por 0,25, es igual a 9,4 ng de REMICADETM marcado•HACA_{complejo}. Utilizando la Ecuación VI, la cantidad total de HACA era igual a la suma de 9,4 ng y 7,5 ng, que es igual a 16,9 ng de HACA. Los 16,9 ng de HACA se encontraban presentes en 4 μl de muestra. La [HACA] era de 16,9 ng/4 μl , que equivale a 4,23 $\mu\text{g/ml}$. Utilizando la Ecuación IX, la cantidad eficaz de REMICADETM era igual a 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de REMICADETM, determinada en la Etapa 1, menos 4,23 $\mu\text{g/ml}$ de HACA determinado en la Etapa 2. En el presente cálculo ejemplar, la [REMICADETM] eficaz era igual a 3,27 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 8: determinación de los niveles de concentración de HUMIRATM y de anticuerpos antifármaco humanos

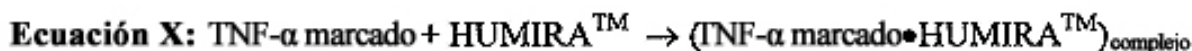
El presente ejemplo describe un método para determinar los niveles de HUMIRATM en una muestra de suero, así como para determinar los niveles de anticuerpos humanos antihumanos (HAHA).

Etapa 1: determinación del nivel de concentración de HUMIRATM en una muestra.

TNF- α puede marcarse con un fluoróforo (por ejemplo Alexa₆₄₇), en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como de IR, o en ambos. El TNF- α marcado se incuba con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir que se una el fármaco anti-TNF- α presente en el suero. El TNF- α marcado también puede incubarse con cantidades conocidas del fármaco anti-TNF- α en una reacción en fase líquida para generar una curva estándar. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión del fármaco anti-TNF- α a TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico en comparación con TNF- α marcado solo. La concentración del fármaco anti-TNF- α presente en la muestra de suero seguidamente puede compararse con la curva estándar y los controles.

Análisis de HPLC-ET de los niveles de HUMIRATM en el suero del paciente. Se marcó TNF- α recombinante humano con un fluoróforo, Alexa Fluor[®] 488, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó TNF- α marcado con diferentes cantidades de HUMIRATM o suero de paciente durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron muestras de 100 μl mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC. Se utilizó la detección de marcaje fluorescente para realizar el seguimiento del TNF- α marcado libre y el complejo inmunológico de TNF- α unido basándose en sus tiempos de retención. Se calcularon los niveles de HUMIRATM a partir de la curva estándar.

Las ecuaciones siguientes son relevantes al presente ensayo:



$$\text{Ecuación XI: } [\text{HUMIRA}^{\text{TM}}] = [(\text{TNF-}\alpha \text{ marcado} \bullet \text{HUMIRA})_{\text{complejo}}]$$

$$\text{Ecuación XII: } [\text{HUMIRA}^{\text{TM}}] = [(\text{TNF-}\alpha \text{ marc.} \bullet \text{HUMIRA}^{\text{TM}})_{\text{complejo}}] / [\text{TNF-}\alpha \text{ marcado}] \times [\text{TNF-}\alpha \text{ marcado}]$$

- 5 En la Etapa 1, se pone en contacto una cantidad conocida de TNF- α marcado con una muestra de suero que contiene HUMIRATM. El TNF- α marcado y HUMIRATM forman un complejo (TNF- α marcado•HUMIRATM)_{complejo}, ver la Ecuación X. Debido a que la totalidad del HUMIRATM formará un complejo con TNF- α marcado, la [HUMIRATM] presente antes de la introducción de TNF- α marcado es igual a la [TNF- α marcado•HUMIRATM]_{complejo}, ver la Ecuación XI. Se calculó la [HUMIRATM] multiplicando la proporción entre [(TNF- α marcado•HUMIRATM)_{complejo}]/[TNF- α marcado] y [TNF- α marcado]. Ver la Ecuación XII. Mediante la integración del área bajo la curva para TNF- α marcado y el área bajo la curva para (TNF- α marcado•F α •HUMIRATM)_{complejo} y dividiendo la integración resultante para (TNF α marcado•HUMIRATM)_{complejo} por la integración resultante para TNF α marcado, se obtiene la proporción [(TNF α marcado•HUMIRATM)_{complejo}] a [TNF α marcado]. La [TNF- α marcado] es conocida *a priori*.
- 10
- 15 Etapa 2: determinación del nivel de anticuerpo humano antihumano, por ejemplo HAHA. Un fármaco anti-TNF- α , por ejemplo HUMIRATM, puede marcarse con un fluoróforo, por ejemplo Alexa₆₄₇, en donde el fluoróforo puede detectarse en los espectros tanto visible como fluorescente. El fármaco anti-TNF- α marcado se incubó con suero humano en una reacción en fase líquida para permitir que se una cualquier HACA presente en el suero. El fármaco anti-TNF- α marcado también puede incubarse con cantidades conocidas del anticuerpo anti-IgG o suero de paciente positivo agrupado en una reacción en fase líquida para generar una curva estándar. Tras la incubación, las muestras se cargan directamente en una columna de exclusión por tamaño. La unión de los autoanticuerpos a fármaco anti-TNF- α marcado resulta en un desplazamiento hacia la izquierda del pico en comparación con fármaco marcado solo. La concentración de HAHA presente en la muestra de suero seguidamente puede compararse con la curva estándar y los controles.
- 20
- 25 Análisis de HPLC-ET de los niveles de HAHA en el suero del paciente. Se marcó HUMIRATM purificado con un fluoróforo. Se incubó HUMIRATM marcado con diferentes diluciones de suero agrupado positivo para HAHA o suero de paciente diluido durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron muestras de 100 μ l mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC. Se utilizó la detección de marcaje fluorescente para realizar el seguimiento de HUMIRATM marcado libre y el complejo inmunológico de HUMIRATM marcado unido, basándose en sus tiempos de retención. Se utilizó la proporción entre HUMIRATM unido y libre para determinar el nivel de HAHA tal como se indica posteriormente.
- 30
- 35 Procedimiento de ensayo de cambio de movilidad para medir HAHA en suero. El principio de este ensayo se basa en el cambio de movilidad del anticuerpo, por ejemplo HAHA, complejo de HUMIRATM marcado con Alexa₆₄₇ frente a HUMIRATM marcado con Alexa₆₄₇ pero libre en cromatografía líquida de alto rendimiento-exclusión por tamaño (HPLC-ET) debido al incremento del peso molecular del complejo. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de HPLC Agilent-1200 utilizando una columna Bio-Sep de 300x7,8 mm SEC-3000 (Phenomenex) con un intervalo de fraccionamiento de pesos moleculares de 5.000 a 700.000 y una fase móvil de 1X PBS, pH 7,3, a un caudal de 0,5 a 1,0 ml/min con detección de marcaje fluorescente, por ejemplo la detección de UV a 650 nm. Enfrente del sistema de HPLC Agilent-1200 con una columna Bio-Sep de 300x7,8 mm SEC-3000 se encontraba un precolumna analítica BioSep de 75x7,8 mm SEC-3000. Se cargó un volumen de muestra de 100 μ l en la columna para cada análisis. Se cargó un volumen de muestra de 100 μ l en la columna para cada análisis. El complejo de HUMIRATM marcado y con HAHA unido se formó mediante la incubación de suero procedente de pacientes tratados con HUMIRA y HUMIRATM marcado en el tampón 1X PBS, pH 7,3, a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis de HPLC-ET.
- 40
- 45

$$\text{Ecuación XIII: } \text{HUMIRA}^{\text{TM}} + \text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado} + \text{HAHA} \rightarrow (\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \bullet \text{HAHA})_{\text{complejo}} + (\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HAHA})_{\text{complejo}}$$

$$\text{Ecuación XIV: } [\text{HUMIRA}^{\text{TM}}]/[\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}] = [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado}]/[\text{HUMIRA} \text{ marcado} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}]$$

$$\text{Ecuación XV: } [\text{HAHA}] = [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}] + [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}]$$

$$\text{Ecuación XVI: } [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}] = [\text{HUMIRA}^{\text{TM}}]_{\text{x}} [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}]/[\text{HUMIRA} \text{ marcado}]$$

$$\text{Ecuación XVII: } [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}] = [\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado}] \times [\text{labeled-HUMIRA}^{\text{TM}} \bullet \text{HAHA}_{\text{complejo}}]/[\text{HUMIRA}^{\text{TM}} \text{ marcado}]$$

$$\text{Ecuación XVIII: } [\text{HUMIRA}^{\text{TM}}]_{\text{cantidad eficaz}} = [\text{HUMIRA}^{\text{TM}}] - [\text{HAHA}]$$

5 Cálculo para la Etapa 2: Se añadió a una muestra de suero una concentración conocida de HUMIRATM marcado. HAHA forma un complejo con HUMIRATM o HUMIRATM marcado. Ver la Ecuación XIII. Se determinó la [HUMIRATM] en la Etapa 1, tal como se ha indicado anteriormente. Mediante la integración del área bajo la curva para HUMIRATM marcadoHAHA_{complejo} y el área bajo la curva para HUMIRATM marcado y dividiendo la integración resultante para (HUMIRATM marcadoTM•HAHA_{complejo}) por la integración resultante para HUMIRATM marcado, se obtiene la proporción [HUMIRATM marcadoTM•HAHA_{complejo}] a [HUMIRATM marcado]. La proporción [HUMIRATM] a [HUMIRATM•HAHA_{complejo}] es igual a la proporción de [HUMIRATM marcado] a [HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo}]. Ver la Ecuación XIV. Debido a que HAHA se equilibra y forma un complejo tanto con HUMIRA como HUMIRATM marcado, la cantidad total de HAHA es igual a la suma de la cantidad de HUMIRATM•HAHA_{complejo} y HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo}. Ver la Ecuación XV. Debido a que la proporción de [HUMIRATM] a [HUMIRATM•HAHA_{complejo}] es igual a la proporción de [HUMIRA marcado] a [HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo}], la concentración de tanto [HUMIRATM•HAHA_{complejo}] como [HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo}] se determinan mediante multiplicación de la proporción de [HUMIRA marcado•HAHA_{complejo}]/[HUMIRA marcado] por [HUMIRATM], determinada en la Etapa 1, y [HUMIRATM marcado], conocida *a priori*, respectivamente. Ver las Ecuaciones XVI y XVII. Debido a que HAHA se acompleja con HUMIRATM, la cantidad eficaz de HUMIRATM disponible en una muestra de suero es la cantidad de HUMIRA, medida en la Etapa 1, menos la cantidad de HAHA, medida en la Etapa 2. Ver la Ecuación XVIII.

10
15
20
25
30
35 Cálculo ejemplar. En el paciente SL03246013, ver la figura 25, se determinó que la [HUMIRATM] era de 16,9 µg/ml; ver la figura 25. Este resultado se obtuvo siguiendo la Etapa 1 y utilizando las Ecuaciones X a XII. 16,9 µg/ml equivale a 67,6 ng/4 µl. Debido a que se utilizaron 4 µl de muestra en la medición en la Etapa 2, se encontraba presente un total de 67,6 ng de HUMIRATM en la muestra analizada. La proporción de [HUMIRATM marcado•HAHA]_{complejo}/[HUMIRATM marcado] para el paciente SL03246013 era de 0,055; ver la figura 25. La [HUMIRATM marcado] introducida en la muestra fue de 37,5 ng/ 100 µl. Debido a que se utilizaron 100 µl de HUMIRATM marcado en la medición en la Etapa 2, se encontraba presente un total de 37,5 ng de HUMIRATM marcado en la muestra analizada. Utilizando la Ecuación XVI, la cantidad total de HUMIRATM•HACA_{complejo} era de 67,6 ng multiplicada por 0,055, que es igual a 3,71 ng de HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo}. Utilizando la Ecuación XVII, la cantidad total de HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo} era de 37,5 ng multiplicada por 0,055, que es igual a 2,06 ng de HUMIRATM marcado•HAHA_{complejo}. Utilizando la Ecuación XV, la cantidad total de HAHA era igual a la suma de 3,71 ng y 2,06 ng, que es igual a 5,77 ng de HAHA. Los 5,77 ng de HAHA se encontraban presentes en 4 µl de muestra. La [HAHA] era de 5,77 ng/4 µl, lo que equivale a 1,44 µg/ml. Utilizando la Ecuación XVIII, la cantidad eficaz de HUMIRATM era igual a 16,99 µg/ml de HUMIRATM, determinada en la Etapa 1, menos 1,44 µg/ml de HAHA determinado en la Etapa 2. En el presente cálculo ejemplar, la [HUMIRATM] eficaz era igual a 15,46 µg/ml.

Ejemplo 9: determinación de la cantidad de un complejo de HACA o HAHA con REMICADE™, REMICADE™ marcado, HUMIRA o HUMIRA marcado.

5 El presente ejemplo describe un método para la determinación de la cantidad de un complejo de HACA o HAHA con REMICADE™, REMICADE™ marcado, HUMIRA o HUMIRA marcado en referencia a un estándar interno.

10 Mediante la utilización de un control interno, por ejemplo biocitina-Alexa488, pueden identificarse y analizarse correctamente artefactos del suero y variaciones de un experimento a otro. La cantidad de control interno, por ejemplo biocitina-Alexa488, es de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 pg por cada 100 ml analizados.

15 Se incubó HUMIRA™ marcado con fluoróforo (FI) con suero de paciente para formar el complejo inmunológico. Se incluyó un péptido pequeño marcado con FI, por ejemplo biocitina-Alexa 488, a modo de control interno en cada reacción. En un caso, se utilizaron cantidades diferentes de anticuerpo anti-IgG humano para generar una curva estándar con el fin de determinar el nivel sérico de HAHA. En otro caso, se utilizó suero de paciente positivo agrupado titulado que había sido calibrado con HAHA purificado para generar una curva estándar con el fin de determinar los niveles séricos de HAHA. En todavía otro caso, el método descrito en el Ejemplo 7 se utilizó para generar una curva estándar con el fin de determinar los niveles séricos de HAHA. Se separó el HUMIRA marcado libre del complejo unido a anticuerpo basándose en su peso molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se utilizó la proporción entre HUMIRA marcado libre y control interno de cada muestra para extrapolar la concentración de HAHA a partir de la curva estándar. Se utilizó una metodología similar para medir los niveles de HUMIRA en muestras de suero de paciente con TNF-α marcado.

25 La proporción inicial de fármaco marcado, es decir, REMICADE™ marcado o HUMIRA marcado, respecto al control interno es igual a 100. Tal como se ilustra en las figuras 23 y 24, cuando la proporción entre fármaco marcado y control interno cae a menos de 95, se infiere que el fármaco marcado se encuentra acomplejado con un compuesto de unión a antifármaco, por ejemplo HACA y HAHA. La proporción entre [fármaco marcado] y [control interno] se obtiene integrando el área bajo la curva para el fármaco marcado y el control interno, y dividiendo después la integración resultante para el fármaco marcado por la integración resultante para el control interno.

Ejemplo 10: determinación de la proporción entre fármacos anti-TNF-α acomplejados y fármacos anti-TNF-α no acomplejados.

35 La proporción entre fármaco anti-TNF-α acomplejado y fármaco anti-TNF-α no acomplejado se obtiene integrando el área bajo la curva para tanto el fármaco anti-TNF-α acomplejado y el fármaco anti-TNF-α no acomplejado, dividiendo después la integración resultante para el fármaco anti-TNF-α acomplejado por la integración resultante para el fármaco anti-TNF-α no acomplejado.

40 El fármaco anti-TNF-α no acomplejado puede ser REMICADE™, con niveles de entre aproximadamente 0 ng y 100 ng en una muestra. La cantidad de REMICADE™ marcado es de aproximadamente 37,5 ng.

45 Mediante la utilización de un control interno, por ejemplo biocitina-Alexa488, pueden identificarse y analizarse correctamente artefactos del suero y variaciones de un experimento a otro. La cantidad de control interno, por ejemplo biocitina-Alexa488, es de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 pg por cada 100 ml analizados.

50 La proporción entre fármaco anti-TNF-α marcado, por ejemplo REMICADE™ o HUMIRA™, y el control interno marcado se obtiene integrando el área bajo la curva para el fármaco anti-TNF-α marcado y el control interno marcado, dividiendo después la integración resultante para el fármaco anti-TNF-α marcado por la integración resultante para el control interno marcado.

55 La proporción $[(\text{fármaco anti-TNF-}\alpha \text{ marcado} \cdot \text{Autoanticuerpo})_{\text{complejo}}]/[\text{control interno}]$ se obtiene integrando el área bajo la curva para el pico de $(\text{fármaco anti-TNF-}\alpha \text{ marcado} \cdot \text{Autoanticuerpo})_{\text{complejo}}$, a partir de un gráfico de intensidad de la señal como función del tiempo de elución del HPLC de exclusión por tamaño, y dividiendo este número por la integración resultante del área bajo la curva para el pico de control interno del gráfico. El fármaco anti-TNF-α marcado puede ser REMICADE™ marcado. El fármaco anti-TNF-α marcado puede ser HUMIRA™ marcado.

60 Ejemplo 11: determinación de la proporción entre TNF-α libre y acomplejado.

El presente ejemplo describe un método para la determinación de la cantidad de un complejo de TNF-α marcado con REMICADE™ o HUMIRA™ en referencia a un estándar interno.

Mediante la utilización de un control interno, por ejemplo biocitina-Alexa488, pueden identificarse y analizarse correctamente artefactos del suero y variaciones de un experimento a otro. La cantidad de control interno, por ejemplo biocitina-Alexa488, es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 ng por cada 100 ml analizados.

- 5 El TNF- α marcado no acomplejado puede presentar niveles de entre aproximadamente 50 ng y 150 ng en una muestra. En determinados casos, la cantidad de TNF- α marcado es de aproximadamente 100,0 ng.

10 Se incubó TNF- α marcado con fluoróforo (FI) con suero de paciente para formar el complejo inmunológico. Se incluyó un péptido pequeño marcado con FI, por ejemplo biocitina-Alexa 488, a modo de control interno en cada reacción. Se generó una curva estándar añadiendo concentraciones conocidas de fármaco anti-TNF- α purificado y después extrapolando a partir de la curva para determinar la concentración, en unidades $\mu\text{g/ml}$.

15 La proporción inicial de TNF- α marcado a control interno era de 100. En el caso de que la proporción de TNF- α marcado a control interno caiga a menos de 95, se infiere que el TNF- α marcado se encuentra acomplejado con un fármaco anti-TNF- α , por ejemplo RemicadeTM o HumiraTM. La proporción entre [TNF- α marcado] y [control interno] se obtiene integrando el área bajo la curva para el TNF- α marcado y el control interno, y dividiendo después la integración resultante para TNF- α marcado por la integración resultante para el control interno.

20 Ejemplo 12: optimización de la terapia de fármaco anti-TNF- α mediante la medición de los niveles de fármaco anti-TNF- α y/o de anticuerpo antifármaco (AAF).

25 El presente ejemplo describe métodos para optimizar la terapia de fármaco anti-TNF- α , reduciendo la toxicidad asociada a la terapia de fármaco anti-TNF- α , y/o el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico con un fármaco anti-TNF- α mediante la medición de la cantidad (por ejemplo el nivel de concentración) de fármaco anti-TNF- α (por ejemplo el nivel de anticuerpo terapéutico anti-TNF- α) y/o de anticuerpo antifármaco (AAF) (por ejemplo el nivel de autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α) en una muestra de un sujeto que recibe terapia de fármaco anti-TNF- α . De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los métodos proporcionados en el presente ejemplo proporcionan información útil para guiar las decisiones de tratamiento, por ejemplo determinando cuándo o cómo ajustar o modificar (por ejemplo incrementar o reducir) la dosis posterior de un fármaco anti-TNF- α , mediante la determinación de cuándo o cómo combinar un fármaco anti-TNF- α (por ejemplo a una dosis incrementada, reducida o a la misma dosis) con uno o más agentes inmunosupresores tales como el metotrexato (MTX) o la azatioprina, y/o mediante la determinación de cuándo o cómo modificar el curso de terapia actual (por ejemplo cambiar a un fármaco anti-TNF- α diferente).

35 Únicamente a fines ilustrativos los escenarios siguientes proporcionan una demostración de cómo los métodos permiten ventajosamente optimizar la terapia y minimizar o reducir la toxicidad (por ejemplo los efectos secundarios) basándose en el nivel de fármaco anti-TNF- α (por ejemplo el nivel de anticuerpo terapéutico anti-TNF- α libre) y/o AAF (por ejemplo el nivel de autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α) en una muestra de un sujeto que recibe terapia de fármaco anti-TNF- α . Los niveles del fármaco anti-TNF- α y de AAF pueden medirse con los nuevos ensayos descritos en la presente memoria.

Escenario nº 1: nivel elevado de fármaco anti-TNF- α con nivel bajo de anticuerpo antifármaco (AAF)

45 Niveles de fármaco=10 a 50 ng/10 μl ; niveles de AAF=0,1 a 2 ng/10 μl . Entre las muestras de pacientes con dicho perfil se incluían las muestras de los pacientes BAB y JAA en la visita 10 ("V10"). Ver la figura 16b.

50 Los pacientes que reciben terapia de fármaco anti-TNF- α y que presentan dicho perfil particular deberían ser tratados con fármacos inmunosupresores como azatioprina (AZA) conjuntamente con el fármaco anti-TNF- α (por ejemplo infliximab).

Escenario nº 2: nivel intermedio de fármaco anti-TNF- α con nivel bajo de AAF.

55 Niveles de fármaco=5 a 20 ng/10 μl ; niveles de AAF=0,1 a 2 ng/10 μl . Entre las muestras de pacientes con dicho perfil se incluían las muestras de los pacientes DGO, JAG y JJH en V10. Ver la figura 16b.

60 Los pacientes que reciben terapia de fármaco anti-TNF- α y que presentan dicho perfil particular deberían ser tratados con fármacos inmunosupresores como azatioprina (AZA) conjuntamente con una dosis más alta del fármaco anti-TNF- α (por ejemplo infliximab). El experto en la materia sabrá que las dosis convenientemente más altas o más bajas a las del curso de terapia actual pueden ajustarse de manera que se optimice la terapia de fármaco, por ejemplo una dosis posterior que es de por lo menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ó 100 veces superior o inferior a la dosis actual.

Escenario nº 3: nivel intermedio de fármaco anti-TNF- α con nivel intermedio de AAF.

Niveles de fármaco=5 a 20 ng/10 µl; niveles de AAF=0,5 a 10 ng/10 µl. Entre las muestras de pacientes con dicho perfil se incluían las muestras del paciente JMM en la visita 10 ("V10") y del paciente J-L en la visita 14 ("V14"). Ver la figura 16b.

5 Los pacientes que reciben terapia de fármaco anti-TNF-α y que presenta este perfil particular deberían ser tratados con un fármaco diferente. A título de ejemplo no limitativo, un paciente sometido a terapia de infliximab (IFX) y con niveles intermedios de IFX y AAF (es decir, HACA) debería cambiarse a terapia con adalimumab (HUMIRA™).

10 Escenario nº 4: nivel bajo de fármaco anti-TNF-α con nivel elevado de AAF.

Niveles de fármaco=0 a 5 ng/10 µl; niveles de AAF=3,0 a 50 ng/10 µl. Entre las muestras de pacientes que presentaban dicho perfil se incluían muestras de todos los pacientes en V14 en la figura 16b.

15 Los pacientes que reciben terapia de fármaco anti-TNF-α y que presentan este perfil particular deberían ser tratados con un fármaco diferente. A título de ejemplo no limitativo, un paciente sometido a terapia de infliximab (IFX) y con un nivel bajo de IFX y un nivel elevado de AAF (es decir, HACA) debería cambiarse a terapia con adalimumab (HUMIRA™).

20 Ejemplo 13. Medición de anticuerpos antiquméricos humanos (HACA) en muestras de suero de paciente mediante ensayo HPLC de cambio de movilidad.

El presente ejemplo describe un procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) destinado a cuantificar el nivel de anticuerpos contra Remicade en muestras de suero de paciente.

25 El principio del ensayo HPLC de cambio de movilidad se basa en el cambio del tiempo de retención de un complejo inmunológico de antígeno-anticuerpo frente a antígeno libre en la cromatografía de HPLC de exclusión por tamaño. Los estándares, los controles y las muestras de paciente se disociaron con ácido durante una hora, antes de la adición de Remicade marcado fluorescentemente y de un control interno marcado fluorescentemente, para reducir el efecto del Remicade circulante. A continuación, todas las reacciones se neutralizaron y se incubaron durante una hora para permitir la formación de complejos inmunológicos. Antes de la inyección en una columna de exclusión por tamaño, se filtraron todas las reacciones y se cargaron en el sistema de HPLC con una temperatura de almacenamiento de 4°C. Se separó el HACA unido a Remicade respecto del Remicade libre mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La cantidad de HACA se determinó a partir de la proporción entre el área del pico de Remicade marcado libre y el área del pico de control interno marcado.

35 La sangre puede recogerse mediante venipunción de los pacientes. Pueden utilizarse los materiales adicionales siguientes: Chromasolv HPLC Water; tubos de microtitulación de 1,2 ml; placa de muestras Nunc de 96 pocillos; 10X PBS pH 7,4; Remicade-AlexaFluor 488/Biotitina-AlexaFluor 488; sistema de filtración estériles de 1 l; Multiscreen HTS, placas de filtración de 96 pocillos GV; precolumna BioSep-SEC-S 3000 de 75 x 7,8 mm; columna de análisis BioSep-SEC-S 3000 de 300 x 7,8 mm; azida sódica al 0,05%/agua para HPLC; detector de capilar de residuos; viales de HPLC; inserciones para muestras de HPLC; colector de vacío Multiscreen HTS; sistema de HPLC Agilent1200.

45 Se preparó una fase móvil para HPLC (solución 1X de PBS, pH 7,3±0,1). Se agruparon 200 ml de 10X PBS, pH 7,4, con 1.750 ml de agua para HPLC en una probeta graduada. Se determinó el pH de lo resultante y se ajustó con HCl 1 N. Se incrementó el volumen total a 2.000 ml con agua para HPLC. Lo resultante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm. Se utilizó una precolumna BioSep-SEC-S 3000 de Phenomenex y una columna analítica BioSep-SEC-S 3000 para un sistema de HPLC. Se ajustaron los detectores de UV para registrar en 280 nm y 210 nm.

50 Se prepararon estándares, controles y muestras de paciente. Se diluyeron estándares, controles y muestras de suero de paciente. Las muestras de suero, los estándares y los controles se prepararon sobre hielo en una placa de 96 pocillos Nunc de 0,5 ml. En primer lugar debe añadirse la muestra de suero, seguido de ácido cítrico 0,5 M, pH 3,0, y finalmente agua para HPLC. Se incubaron los estándares, los controles y las muestras durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de placas para conseguir la disociación completa de las muestras. La placa se cubrió con hoja de aluminio durante la incubación. Se añadió Remicade-AlexaFluor488/Biotitina-AlexaFluor488. Se prepararon volúmenes especificados de Remicade-AlexaFluor488/Biotitina-AlexaFluor488 en agua para HPLC. Se añadieron 6 ml de agua para HPLC a los pocillos adecuados. Se añadió Remicade-AlexaFluor488/Biotitina-AlexaFluor488 a los pocillos adecuados.

Otros ácidos orgánicos pueden resultar adecuados para la utilización con el presente ensayo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el ácido ascórbico o el ácido acético.

Neutralización de muestras. Se añadió un volumen especificado de 10X PBS, pH 7,4, a los pocillos adecuados. Se mezclaron las muestras utilizando una pipeta seis veces. Se incubaron los estándares, los controles y las muestras durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de placas para conseguir la formación completa de complejos inmunológicos. La placa se cubrió con hoja de aluminio durante la incubación. La mezcla incubada se transfirió a una nevera a 4°C en caso de no transferirse inmediatamente a los viales de HPLC.

Se preparó estándar de columna en una nueva placa para muestras con 15 µl de estándar de columna y se añadieron 285 µl de fase móvil al mismo pocillo. Los estándares, los controles y las muestras se diluyeron hasta 2% de suero. El volumen especificado de cada estándar, control y muestra se transfirió a los pocillos apropiados en una nueva placa para muestras. A la misma placa para muestras se añadió el estándar de columna en el que se había preparado. Se añadió el volumen especificado de 10X PBS, pH 7,4, a los pocillos apropiados. Se añadió el volumen especificado de agua para HPLC a los pocillos adecuados. Se mezclaron las muestras utilizando una pipeta seis veces. Las muestras se filtraron a través de una placa de filtración Multiscreen de 0,2 µm. La placa de recolección se añade bajo la placa de filtración. Se transfirieron 295 µl de muestra a la posición respectiva en la placa de filtración. Se incorporó la placa de filtración con muestras y placa de recolección al colector de vacío. Se filtraron las muestras hacia el interior de la placa de recolección. Se transfirieron estándares, controles y muestras a viales de HPLC.

Se utilizó una pipeta para transferir 250 µl de estándares, controles y muestras a viales de inyección de HPLC marcados. Se transfirieron estándares, controles y muestras a una HPLC. Los parámetros de la HPLC pueden incluir los siguientes: Volumen de inyección: 100 µm; caudal: 1,0 ml/min. de tampón de elución A; Tiempo de apagado: 20 min.; tiempo de estabilización ("post time"): desactivado; presión mínima: 0 Bar; presión máxima: 400 Bar; termostato: desactivado; los parámetros DAD eran 210 nm y 280 nm con 4 nm y Referencia desactivada; anchura de pico (tiempo de respuesta): >0,1min. (2s); división: 4 nm; parámetros de DFL Excitación: 494 nm, Emisión: 519 nm; una inyección en cada vial; volumen de inyección de 100 µl para cada muestra.

Ejemplo 14. Ensayo de disociación ácida de HACA.

Tal como se ilustra en la figura 26, una etapa de disociación ácida permite el correcto equilibrado de las especies acomplejadas antes de medir los niveles de concentración de las especies constituyentes. Los niveles elevados de fármaco pueden interferir con la detección de anticuerpos antifármaco tales como HACA. Tal como se representa en la figura 26, la etapa de disociación ácida permite el equilibrado de los complejos de fármaco marcado "A" o fármaco no marcado "C" con el anticuerpo antifármaco HACA, "B". Tras la introducción del ácido para disociar el complejo BC, pueden añadirse niveles elevados de A. A continuación, la muestra puede diluirse y puede medirse la concentración de "AB". La concentración de "BC" tras la etapa de disociación ácida puede calcularse basándose en las cantidades conocidas o medidas de "A" y "B".

Las figuras 27 y 28 ilustran el porcentaje de infliximab marcado libre como función de log porcentaje de suero de paciente con y sin una etapa de disociación ácida, respectivamente.

Pueden utilizarse los materiales siguientes en dicho ensayo: Remicade-Alexa488/Biotina-Alexa488; suero humano normal; control positivo para HACA (CPH); estándar de columna; 10X PBS, 1X PBS, pH 7,3; placa de filtración Multiscreen; placa para muestras; HCl 1 N; ácido cítrico 0,5 M. Se prepararon titulaciones de CPH en NHS. Se prepararon diluciones en serie de dos veces mediante la transferencia de 35 µl de una muestra a 35 µl de NHS.

Pueden prepararse las soluciones siguientes para la utilización con dicho ejemplo:

Solución 1: 90 µl de 25% de CPH/75% de NHS,

Solución 2: 90 µl de 12,5% de CPH/87,5% de NHS,

Solución 3: 90 µl de 6,25% de CPH/93,75% de NHS.

Las muestras pueden mantenerse sobre hielo antes, durante y después del análisis descrito en la presente memoria.

Se prepararon las soluciones siguientes:

Solución 4: una solución tampón; solución 5: una solución estándar de columna; solución 6: NHS al 2%; solución 7: NHS al 2% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biotina-Alexa488.

A dichas soluciones se añadieron muestras de suero, ácido cítrico, agua para HPLC en una placa para muestras de 96 pocillos. Se añadieron muestras de suero a los pocillos respectivos. Se añadió ácido cítrico 0,5 M, pH 3,0, a los pocillos respectivos. Se añadió agua para HPLC a los pocillos respectivos.

Se preparó una serie de muestras, incluyendo lo siguiente: Solución 8: tampón,

Solución 9: 15 µl de estándar de columna y 285 µl de 1X PBS, pH 7,3; solución 10: NHS al 2%; solución 11: NHS al 2% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biotina-Alexa488,

Solución 12: CPH al 2% + 0% de NHS + 37,5 Remicade-Alexa488/Biotina-Alexa488,

Solución 13: CPH al 1% + NHS al 1% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488,
 Solución 14: CPH al 0,5% + NHS al 1,5% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488, solución 15: CPH al 0,25% + NHS al 1,75% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488, solución 16: CPH al 0,125% + NHS al 1,875% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488,
 Solución 17: CPH al 0,063% + NHS al 1,937% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488,
 Solución 18: CPH al 0,031% + NHS al 1,969% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488,
 Solución 19: CPH al 0,016% + NHS al 1,984% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488, solución 20: CPH al 2% + NHS al 0% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488, solución 21: control elevado,
 Solución 22: control intermedio,
 Solución 23: control bajo,
 Solución 24: NHS al 2%,
 Solución 25: NHS al 2% + 37,5 Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488.

A todas las muestras se añadieron 5,5 µl de ácido cítrico 0,5 M, pH 3 y 10,9 ml de agua para HPLC.

15 Se prepararon 450 µl de Remicade-Alexa488/Biocitina-Alexa488 0,074 mg/ml. Se añadieron 6 µl de agua para HPLC a tres pocillos separados. A los pocillos restantes se añadieron 6 µl de Remicade-AlexaFluor488/Biocitina-AlexaFluor488 0,074 mg/ml.

20 Neutralización de muestras. Se añadieron 27,6 µl de 10X PBS, pH 7,3, a todos los pocillos excepto a uno. Se mezclaron las muestras utilizando una pipeta seis veces. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador de placas. Se añadieron 15 µl de estándar de columna al pocillo al que no se añadieron 27,6 µl de 10X PBS, pH 7,3. Se añadieron 285 µl de 1X PBS, pH 7,3, al pocillo al que no se añadieron 27,6 µl de 10X PBS, pH 7,3. Las muestras se diluyeron hasta 2% de suero.

25 Se transfirieron 18,4 µl de cada muestra a los pocillos correspondientes de la nueva placa para muestras. Utilizando la misma placa para muestras en la que se había preparado el estándar, se añadieron 22,6 µl de 10X PBS a todos los pocillos excepto al pocillo al que no se habían añadido los 27,6 µl de 10X PBS, pH 7,3. Se añadieron 254 µl de agua para HPLC a todos los pocillos excepto al pocillo al que no se habían añadido 27,6 µl de 10X PBS, pH 7,3. Se mezclaron las muestras utilizando una pipeta. Se transfirieron 295 µl de estándares, controles y muestras a una placa de filtración de 96 pocillos. Utilizando una pipeta, se transfirieron 250 µl de estándares, controles y muestras a viales de inyección de HPLC.

Ejemplo 15. Caso de paciente 1 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF-α

35 El ensayo inicial indicó la ausencia de HACA en el suero y niveles de IFX en rápida eliminación. Se calculó que la semivida de IFX era de 46,9 horas. Se incrementó la dosis y la frecuencia de IFX. El paciente respondió. Ver la figura 29 para una descripción de los niveles de IFX como función del tiempo.

40 Tres meses después, el paciente presentó una recaída, se realizó un nuevo ensayo del paciente y se encontró que presentaba un nivel bajo de HACA e IFX indetectable. Todas las citoquinas analizadas se encontraban dentro de intervalos normales.

Paciente	HACA* (µg/ml)	IFX (µg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
GRD0065	0,34	ND	5,32	0,06	2,38	6,16

45 El tratamiento sugerido era azatioprina y opcionalmente el cambio a una terapia de fármaco anti-TNF alternativo. Además, el seguimiento continuo del paciente para detectar la formación de otros anticuerpos antifármaco (AAF).

Ejemplo 16. Caso de paciente 2 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF-α.

50 Cuatro meses después de los ensayos iniciales, se sometieron a ensayo dos muestras, que se recogieron separadas por 8 días. Los niveles de HACA eran elevados y los niveles de IFX eran indetectables. La recomendación es que el paciente debe cambiarse a un terapéutico anti-TNF alternativo.

Paciente	Fecha de recolección	HACA (µg/ml)	IFX (µg/mL)	IFN-γ (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
GRD0077	Día 1	>26	ND	1,57	0,61	3,38	0,00
GRD0078	Día 2	>26	ND	1,31	0,24	2,01	0,00

Ejemplo 17. Caso de paciente 3 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF-α

55

Se calculó la concentración de IFX con una curva estándar generada mediante la reacción de diferentes concentraciones de IFX contra TNF- α marcado. La muestra de los 11 días era de 3,8 $\mu\text{g/ml}$ en diluciones 1:25 (por lo menos 3 semividas). Ver la figura 30 para una descripción de los niveles séricos de infliximab como función del tiempo. Ver la figura 31 para una descripción de los niveles séricos de TNF- α como función del tiempo. El tratamiento recomendado es combinar IFX con un fármaco inmunosupresor u opcionalmente cambiar a un fármaco anti-TNF alternativo.

Ejemplo 18. Caso de paciente 4 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF- α

Se encontró que un paciente presentaba un nivel elevado de HACA e IFX indetectable. Los niveles de TNF- α se encontraban elevados; todas las demás citoquinas analizadas se encontraban dentro de intervalos normales. El tratamiento sugerido es cambiar a una terapéutico anti-TNF alternativo.

Paciente	HACA ($\mu\text{g/ml}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
GRD0009	21,75	ND	1,07	0,08	2,71	35,54

La figura 32 muestra los perfiles de cambio de movilidad de IFX marcado con FI para el caso de paciente n^o 1 (A), el caso de paciente n^o 2 (B, C) y el caso de paciente n^o 4 (D).

Ejemplo 19. Caso de paciente 5 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF- α

Se encontró que un paciente presentaba un nivel bajo de HACA e IFX indetectable. Los niveles de TNF- α se encontraban muy elevados; todas las demás citoquinas analizadas se encontraban dentro de intervalos normales. La terapia sugerida es incrementar la dosis o la frecuencia de administración de IFX o cambiar a un fármaco anti-TNF alternativo conjuntamente con la adición de un fármaco inmunosupresor. Además, una terapia sugerida es continuar realizando un seguimiento del paciente para ver si se incrementan los niveles de HACA/ADA.

Paciente	HACA ($\mu\text{g/ml}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SK12100143	2,80	ND	2,78	1,38	7,79	161,01

Ejemplo 20. Caso de paciente 6 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF- α

Se encontró que un paciente presentaba un nivel intermedio de HACA y niveles bajos de IFX. Los niveles de IL-1 β e IL-6 eran muy elevados. El nivel de IFN- γ se encontraba ligeramente elevado y el de TNF- α se encontraba dentro del intervalo normal. El tratamiento sugerido es cambiar a un fármaco anti-TNF- α diferente o una terapia con un fármaco con diana en un mecanismo diferente (por ejemplo un anticuerpo monoclonal inhibidor de receptor de IL-6, tal como Actemra (tocilizumab) conjuntamente con la adición de un fármaco inmunosupresor).

Paciente	HACA ($\mu\text{g/ml}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SK07160939	9,42	11,06	13,31	366,11	2302,41	2,68

Ejemplo 21. Caso de paciente 7 de un paciente con recaída bajo terapia anti-TNF- α

Se encontró que el paciente presentaba niveles bajos de HACA. Se detectaron niveles bajos de IFX. Los niveles de IFN- γ se encontraban elevados; todas las demás citoquinas analizadas se encontraban dentro de intervalos normales. El tratamiento sugerido es incrementar la dosis de IFX o cambiar a una terapia con un fármaco con diana en un mecanismo diferente (por ejemplo un anticuerpo anti-IFN- γ tal como fontolizumab). Alternativamente, el tratamiento sugerido puede ser añadir un fármaco inmunosupresor.

Paciente	HACA ($\mu\text{g/ml}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SK12020346	ND	4,02	98,87	0,52	8,97	7,83

La figura 33 muestra los perfiles de cambio de movilidad de IFX marcado con FI para el caso de paciente n^o 5 (A), el caso de paciente n^o 6 (B, C) y el caso de paciente n^o 7 (D, E).

Ejemplo 22. Niveles de citoquinas en diferentes grupos de suero de paciente.

El presente ejemplo describe los niveles de citoquinas, tales como, aunque sin limitarse a ellos, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y TNF α , en muestras de suero de control normal, CU tratada con infliximab, EC tratado con Humira y positivas para HACA. Tal como se ilustra en la figura 34, el suero de paciente positivo para HACA típicamente presentaba niveles más altos de todas las citoquinas analizadas (por ejemplo IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y TNF α). Basándose en la presencia de autoanticuerpos contra IFX (es decir, HACA) y niveles altos de citoquinas, estos pacientes deberían cambiarse a un fármaco anti-TNF alternativo, opcionalmente en combinación con un fármaco inmunosupresor.

Ejemplo 23: cuantificación de estándares de HACA mediante ensayo de disociación ácida.

El presente ejemplo describe la cuantificación de HACA en muestras estándares utilizando el ensayo de disociación ácida descrito en el Ejemplo 14 con una cantidad fija de Remicade™-AlexaFluor488 y cantidades variables de Remicade™ no marcado. En particular, pueden determinarse concentraciones de HACA comprendidas entre 25 U/ml y 100 U/ml en presencia de Remicade™ no marcado en varios órdenes de magnitud. Los datos para la determinación de HACA en un estándar de baja concentración (25 U/ml), un estándar de concentración intermedia (50 U/ml) y un estándar de concentración elevada (100 U/ml) se presentan en las Tablas 8, 9 y 10, respectivamente. La concentración de Remicade™ no marcado en cada muestra se determinó utilizando el ensayo de cambio de movilidad descrito en el Ejemplo 1. Tras la disociación ácida y el equilibrado, el complejo resultante de HACA/Remicade™-AlexaFluor488 en una muestra dada se determinó mediante HPLC-ET y se calculó HACA total siguiendo los cálculos presentados en el Ejemplo 7. Se proporciona el porcentaje de recuperación de HACA en cada análisis (basándose en la concentración conocida de HACA en el estándar).

Tabla 8. Cuantificación de estándar de HACA de baja concentración (25 U/ml) con concentración variable de Remicade.

Remicade™ (µg/ml)	Resultado de cambio de movilidad					Concentración final		
	Promedio (U/ml)	SD	CV(%)	% de cambio	Recuperación (%)	HACA unido a Remicade™ no marcado	HACA total	Recuperación (%)
0	27,30	1,22	4,47	NA	109,19	NA	27,3	109,19
100	4,20	0,01	0,26	-84,60	16,82	22,35	26,55	106,21
50	6,94	1,67	24,00	-74,56	27,78	18,46	25,40	101,61
25	9,87	1,28	12,98	-63,86	39,47	13,11	22,98	91,91
12,5	12,71	0,71	5,62	-53,42	50,86	8,45	21,16	84,65
6,25	15,67	0,70	4,48	-42,58	62,70	5,21	20,88	83,52
3,125	18,03	1,10	6,08	-33,96	72,11	2,99	21,02	84,09
1,56	20,97	1,39	6,62	-23,17	83,89	1,74	22,71	90,85
0,78	23,30	0,49	2,09	-14,65	93,19	0,97	24,26	97,06

Tabla 9. Cuantificación de estándar de HACA de concentración intermedia (50 U/ml) con concentración variable de Remicade.

Remicade™ (µg/ml)	Resultado de cambio de movilidad					Concentración final		
	Promedio (U/ml)	SD	CV(%)	% de cambio	Recuperación (%)	HACA unido a Remicade™ no marcado	HACA total	Recuperación (%)
0	54,16	0,80	1,49	NA	108,33	NA	54,16	108,32
100	7,01	0,80	11,36	-87,06	14,02	37,25	44,25	88,51
50	12,22	0,51	4,14	-77,45	24,43	32,46	44,68	89,36
25	19,15	0,19	1,00	-64,65	38,29	25,44	44,59	89,17
12,5	25,55	0,81	3,17	-52,83	51,09	16,97	42,52	85,04
6,25	31,71	0,33	1,04	-41,46	63,42	10,53	42,24	84,49
3,125	38,32	0,46	1,20	-29,25	76,64	6,38	44,70	89,40
1,56	42,32	0,02	0,05	-21,87	84,63	3,51	45,83	91,65
0,78	49,19	0,85	1,73	-9,19	98,37	2,04	51,23	102,45

Tabla 10. Cuantificación de estándar de HACA de concentración elevada (100 U/ml) con concentración variable de Remicade.

Remicade™ (µg/ml)	Resultado de cambio de movilidad					Concentración final		
	Promedio (U/ml)	SD	CV(%)	% de cambio	Recuperación (%)	HACA unido a Remicade™ no marcado	HACA total	Recuperación (%)
0	104,61	0,50	0,48	NA	104,61	NA	104,61	104,61
100	15,34	0,24	1,59	-85,34	15,34	81,54	96,88	96,88
50	25,86	0,61	2,37	-75,29	25,86	68,71	94,57	94,57
25	40,50	1,42	3,50	-61,28	40,50	53,82	94,32	94,32
12,5	59,90	0,16	0,27	-42,74	59,90	39,80	99,70	99,70
6,25	76,27	0,94	1,23	-27,10	76,27	25,34	101,60	101,60

Remicade™ (µg/ml)	Resultado de cambio de movilidad					Concentración final		
	Promedio (U/ml)	SD	CV(%)	% de cambio	Recuperación (%)	HACA unido a Remicade™ no marcado	HACA total	Recuperación (%)
3,125	88,80	1,01	1,14	-15,11	88,80	14,77	103,58	103,58
1,56	94,38	0,72	0,76	-9,78	94,38	7,83	102,21	102,21
0,78	104,80	1,26	1,20	0,18	104,80	4,35	109,15	109,15

5

Ejemplo 24: un nuevo paradigma de terapia farmacológica anti-TNF.

El paradigma existente de terapia farmacológica anti-TNF, basado en el nivel de fármaco y el nivel de HACA determinado en una muestra del paciente, se describe de manera general en la Tabla 11, a continuación:

10

Tabla 11

Paradigma actual		
HACA	FÁRMACO	Acción
BAJO	BAJO	Incrementar dosis
INTERM.	BAJO	Incrementar dosis
ALTO	BAJO	Cambiar terapia
BAJO	INTERM.	Continuar
INTERM.	INTERM.	Indefinido
ALTO	INTERM.	Cambiar terapia
BAJO	ALTO	Continuar
INTERM.	ALTO	Continuar
ALTO	ALTO	Cambiar terapia

15

Sin embargo, este paradigma resulta complicado por la elevada variabilidad de los niveles de fármaco en los pacientes con nivel indefinido de HACA.

20

El paradigma terapéutico del presente método utiliza un índice de actividad/gravedad de la enfermedad derivado de un análisis basado en un algoritmo de uno o más marcadores biológicos para la selección de la terapia, la optimización de la terapia, la reducción de la toxicidad, el seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico o una combinación de los mismos, con un fármaco anti-TNF. En determinados aspectos, las acciones que deben tomarse basándose en este nuevo paradigma se indican de manera general para diversos escenarios ilustrativos en la Tabla 12, a continuación:

25

Tabla 12. Paradigma del presente método

HACA	FÁRMACO	Índice de actividad de la enfermedad	Acción
BAJO	BAJO	BAJO	Continuar
BAJO	BAJO	INTERM.	Incrementar dosis

BAJO	BAJO	ALTO	Incrementar dosis
BAJO	INTERM.	BAJO	Continuar
BAJO	INTERM.	INTERM.	Incrementar dosis
BAJO	INTERM.	ALTO	Incrementar dosis
BAJO	ALTO	BAJO	Continuar o Reducir dosis para evitar toxicidad
BAJO	ALTO	INTERM.	Continuar
BAJO	ALTO	ALTO	Cambiar terapia
INTERM.	BAJO	BAJO	Continuar
INTERM.	BAJO	INTERM.	Incrementar dosis
INTERM.	BAJO	ALTO	Incrementar dosis o cambiar terapia
INTERM.	INTERM.	BAJO	Continuar
INTERM.	INTERM.	INTERM.	Continuar
INTERM.	INTERM.	ALTO	Cambiar terapia
INTERM.	ALTO	BAJO	Continuar o Reducir dosis para evitar toxicidad
INTERM.	ALTO	INTERM.	Continuar
INTERM.	ALTO	ALTO	Cambiar terapia
ALTO	BAJO	BAJO	Cambiar terapia
ALTO	BAJO	INTERM.	Cambiar terapia
ALTO	BAJO	ALTO	Cambiar terapia
ALTO	INTERM.	BAJO	Cambiar terapia
ALTO	INTERM.	MOD	Cambiar terapia
ALTO	INTERM.	ALTO	Cambiar terapia
ALTO	ALTO	BAJO	Cambiar terapia
ALTO	ALTO	INTERM.	Cambiar terapia.
ALTO	ALTO	ALTO	Cambiar terapia

5 Se observa que pueden seguirse las acciones terapéuticas para pacientes con niveles de HACA intermedios mediante el seguimiento de los cambios de la actividad de la enfermedad. En determinados casos, los niveles elevados de HACA pueden motivar un cambio de la terapia a pesar de otros parámetros, debido a la naturaleza inmunológica de la condición.

Ejemplo 25: detección de niveles bajos de Remicade en muestras de tejido.

10 Se ha demostrado que los pacientes con artritis reumatoide (AR) presentan una respuesta inferior a 100 ng/ml de Remicade durante el curso del tratamiento. Se ha desarrollado un ensayo HPLC de cambio de movilidad de Remicade tal como se comenta en la presente memoria que detecta la presencia de Remicade en el suero del paciente, que evita muchos de los problemas del formato ELISA. En determinados aspectos, el límite inferior actual de cuantificación (LIAC) para el presente ensayo inventivo es de aproximadamente 0,49 µg/ml, permitiendo el análisis de la mayoría de los pacientes. La investigación actual de los presentes inventores indica que el ajuste de diversos parámetros del detector de fluorescencia (cambiar la longitud de onda de emisión a 525 nm e incrementar la ganancia del FMT a 16), el ensayo HPLC de cambio de movilidad de Remicade puede detectar cuantitativamente incluso tan solo 50 ng/ml de Remicade en el suero con elevada reproducibilidad. De hecho, este nivel de sensibilidad permite el análisis de niveles de Remicada en muestras de tejido pequeñas (<10 mg). La detección de Remicade en el tejido nos permite conocer más sobre la cantidad de Remicade que ha alcanzado el sitio de inflamación, proporcionando más información sobre la farmacocinética y detalles mecanísticos del fármaco.

Métodos

25 El aislamiento de la proteína del tejido del paciente se consigue mediante la extracción de células completas. Se introducen trozos de 1 a 10 mg de tejido en un tubo y después se congelan en un ambiente criogénico. A continuación se homogeneiza la muestra criogénica utilizando el fragmentador mecánico de tejidos Covaris CryoPrep. Tras la pulverización, la muestras se transfieren a un tubo que contiene ~300 µl de tampón de extracción (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato al 0,25%, EDTA 1 mM) que contiene un cóctel de inhibidor de proteasa de mamífero (Sigma, St. Louis, Mo). A continuación, las muestras se transfieren inmediatamente a la parte acústica del instrumento CryoPrep para la fragmentación adicional mediante sonicación. Seguidamente las muestras se incuban durante 45 min. sobre hielo para permitir la disociación completa de los componentes celulares. Los extractos se centrifugan a 4°C durante 15 min. a alta velocidad. Se dividen en alícuotas los sobrenadantes y se congelan a -80°C. Las concentraciones de proteínas se cuantifican utilizando el ensayo de proteínas de Lowry (Bio-Rad). Se descongela una alícuota de 200 µl y después se añaden 5,0 ng de TNF-α recombinante marcado fluorescentemente (TNF-Alexa488). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución se encuentra en equilibrio y se han formado diversos complejos de TNF-Alexa488/Remicade de

peso molecular creciente. Tras la filtración, se inyecta la muestra en una columna de HPLC de exclusión por tamaño BioSep S-3000 Phenomenex. Este ensayo en fase líquida en tiempo real resuelve los complejos de Remicade-TNF respecto de TNF libre basándose en el tamaño de los complejos formados.

5 Aunque el límite inferior actual de cuantificación resulta adecuado para la mayoría de pacientes, existe una necesidad de incrementar la sensibilidad para la utilización en pacientes de AR (ver anteriormente). En un aspecto, el ensayo se basa en la detección de 25 ng de TNF-Alexa488 en una inyección de 100 μ l en la columna de HPLC de exclusión por tamaño. La utilización de fluorescencia como el método de detección proporciona flexibilidad para la optimización de las longitudes de onda de excitación y emisión, así como de la capacidad de incrementar la ganancia del tubo fotomultiplicador (FMT). Los ajustes actuales para la validación del ensayo de Remicade son:
 10 DFL λ_{Ex} =494, λ_{Em} =519
 Ganancia de FMT=12

15 Estos ajustes se fijan basándose en las longitudes de onda publicadas para el grupo de AlexaFluor 488, así como los ajustes de ganancia del FMT normales para el DFL Agilent 1200 series. El incremento de la ganancia del FMT incrementa la señal y el ruido, pero hasta determinado factor el incremento de la señal es superior al incremento del ruido. El salto de ganancia a ganancia es igual a un factor de 2. Los parámetros más importantes para optimizar son las longitudes de onda de excitación y emisión y aunque los máximos publicados son un punto de partida útil, con frecuencia resulta necesario optimizarlos porque la excitación depende de los compuestos mismos, así como de las características del instrumento específico.

20 Al detectar cantidades bajas de Remicade, aparece un pico específico que refleja un complejo de TNF-Alexa488 y Remicade en un tiempo de retención de 9,2 minutos. En un aspecto, resulta importante que la altura de este pico se encuentre por lo menos 3 veces sobre el fondo y que la concentración sérica calculada en múltiples réplicas presente un coeficiente de varianza inferior a 20%. La proporción de señal a ruido de este pico específico de Remicade-TNF-Alexa488 respecto al fondo de suero humano normal puede ser, de esta manera, el punto de partida para incrementar la sensibilidad del ensayo.

25 Para incrementar la sensibilidad, se optimizó la ganancia del FMT, así como las longitudes de onda de excitación y emisión, basándose en los resultados de los gráficos de amplificación y de isoabsorbancia. Se tituló el Remicade en presencia de diluciones de TNF-Alexa488 a diferentes niveles de ganancia del FMT comprendidos entre 12 y 18 utilizando las longitudes de onda actuales de excitación y emisión, de 494 y 519 nm, respectivamente.

30 La figura 35 muestra una cantidad estándar de TNF-Alexa488, así como el pico pequeño en R_t =9,2 minutos que refleja un complejo de Remicade-TNF (panel superior). Al reducir la cantidad de TNF-Alexa488 a 2,5 ng, resulta evidente que el fondo de suero humano normal al 4% empieza a interferir con la resolución del pico de TNF libre, así como el pico en 9,2 minutos que refleja un complejo de Remicade-TNF (panel intermedio). El incremento de la ganancia del FMT a 18 (panel inferior) incrementa la señal y el ruido igualmente (los datos son similares para todos los niveles del FMT).

35 Resulta evidente a partir de los datos que la fluorescencia de fondo del suero humano normal interfiere con la cuantificación de los niveles bajos de Remicade utilizando los ajustes actuales. Para incrementar la sensibilidad del ensayo, resultan necesarias modificaciones adicionales de los ajustes del DFL para reducir la señal de fondo del suero. Para investigar lo anterior, se llevaron a cabo experimentos a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión basándose en los resultados de los gráficos de isoabsorbancia. Los gráficos de isoabsorbancia se obtuvieron de suero humano normal, TNF-Alexa488, fase móvil (1X PBS/BSA al 0,1%) y agua.

40 La figura 36 muestra las longitudes de onda de excitación en el eje Y y las longitudes de onda de emisión se dibujan en el eje X. La comparación entre los gráficos para el suero humano normal (panel superior) y TNF-Alexa488 (panel inferior) muestran un solapamiento significativo en los máximos tanto de excitación como de emisión (vértice de la región en forma de V en los gráficos). El cambio de la longitud de onda de emisión a por lo menos 525 nm probablemente mantendrá una sensibilidad elevada para TNF-Alexa488, reduciendo simultáneamente el fondo de suero normal. La longitud de onda de emisión se fijó en 525 nm y después se repitieron los experimentos observando TNF-Alexa488, así como el fondo de suero humano normal. Se inyectó TNF-Alexa488 en presencia de NHF al 4% y se evaluó la proporción de señal a ruido.

45 La figura 37 muestra el análisis de suero humano normal (panel izquierdo) y de 25 ng de TNF-Alexa488 (panel derecho) mediante HPLC con los ajustes indicados. El nivel de fondo de fluorescencia del suero humano normal se encontraba muy reducido. Tras demostrar que el nivel de fluorescencia de fondo del suero se encontraba reducido, se evaluó la proporción de señal a ruido del ensayo a diferentes niveles de ganancia del FMT, comprendidos entre 12 y 18. Los resultados del análisis, presentados en la Tabla 13, a continuación, establecen que una ganancia del FMT de 16 proporciona un beneficio significativo.

Tabla 13

FMT	Emisión	Área promedio NHS fondo (n=2)	Área promedio pico de TNF-Alexa488 (n=2)	Señal/Ruido
12	519	45,95	544	11,84
12	525	17,4	481,5	27,67
16	519	1053	8747	8,31
16	525	210,5	8019,5	38,10

A continuación, se sondeó la sensibilidad del ensayo generando curvas estándares, tales como el gráfico mostrado en la figura 38. Se utilizaron 2,5 ng de TNF-Alexa488 por cada inyección; se tituló el Remicade en el intervalo de 50 ng/ml a 5,86 µg/ml para establecer el límite de detección. Se realizó nuevamente un seguimiento del pico en el tiempo de retención 9,2 como criterio para la proporción de señal a ruido y se utilizó la concentración más baja que repetidamente (n=20) daba lugar a una altura de pico 3:1 para calcular el LDC. Se presentan los resultados de este tipo de análisis en la tabla a continuación:

Tabla 14

Ajustes experimentales: Ganancia del FMT=16 λEx = 494 nm, λEm = 525 nm 2,5 ng Alexa488/100 µl de inyección	
LOB (área)	0,040
LOD (área)	0,044
LDC (n=20)	13,00 ng/mL
LIAC (n=20)	51,02 ng/mL
	CV% = 21,07
	Precisión=111,40%

Mediante el cambio de la longitud de onda de emisión a 525 nm y el incremento de la ganancia del FMT a 16, el ensayo de cambio de movilidad ahora puede detectar cuantitativamente incluso tan solo 50 ng/ml de Remicade en el suero con elevada reproducibilidad. La optimización adicional puede incrementar la sensibilidad en mayor grado, aunque el nuevo formato debería permitir el análisis de los pacientes de AR que muestran respuesta incluso a concentraciones séricas de Remicade muy bajas. La correlación entre los niveles bajos de Remicade y la respuesta del paciente, el resultado clínico y marcadores biológicos relacionados permiten tomar decisiones para un enfoque más personalizado al tratamiento.

Ejemplo 26: análisis de estudio clínico del ensayo de cambio de movilidad vs. ELISA.

Se llevaron a cabo estudios iniciales tal como anteriormente utilizando muestras de pacientes con ECA activa (N=117) y pacientes de CU (N=10) tratados con infliximab durante varias semanas. Se compararon los datos de ensayo de cambio de movilidad con los resultados de ELISA.

Tal como se muestra en la figura 39, ambos métodos se correlacionaban (coeficiente de correlación=0,812, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) para los datos recogidos sobre los límites inferiores de cuantificación) en la determinación de infliximab en las muestras. Se demostró que 6% de las muestras en las que se había determinado mediante ELISA que eran negativas para infliximab, eran positivas para infliximab según el ensayo de cambio de movilidad. Ninguna de las muestras que se había determinado que eran negativas para infliximab por el ensayo de cambio de movilidad, eran positivas para infliximab según el ensayo de cambio de movilidad. Tal como se determinó mediante el ensayo de cambio de movilidad, cuatro muestras negativas para infliximab se encontró que eran positivas para HACA. Los datos del ELISA y del ensayo de cambio de movilidad también se encontraban correlacionados para la determinación de HACA, tal como se muestra en la figura 40. Treinta y siete de las muestras consideradas negativas para HACA según el ELISA se encontró que eran positivas para HACA en el ensayo de cambio de movilidad.

Se tabularon frente al tiempo los recuentos acumulados por semana de muestras positivas para HACA, tal como se muestra en la figura 41. Aunque los datos del ensayo de cambio de movilidad (figura 41, línea superior) y del ELISA (figura 41, línea inferior) empezaron a converger tras 60 semanas, el ensayo de cambio de movilidad resultó en un recuento más alto de los especímenes positivos para HACA en puntos temporales anteriores. La prueba exacta de Fisher se aplicó a los datos recogidos en diversos puntos temporales. Los valores de p determinados por el ensayo fueron 0,0381, 0,0240 y 0,6791 a las 46, 50 y 66 semanas, respectivamente. Conjuntamente los estudios clínicos indican que el ensayo de cambio de movilidad supera la variabilidad y limitaciones de interferencia del ELISA. La tecnología también es aplicable a un amplio espectro de proteínas terapéuticas para condiciones tales como artritis reumatoide y enfermedad intestinal inflamatoria. Dada la necesidad crítica de una detección precisa de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco en el desarrollo de estrategias terapéuticas, el ensayo de cambio de movilidad permite un mejor control del tratamiento del paciente.

Ejemplo 27: evaluación de un nuevo ensayo homogéneo de cambio de movilidad para la medición de los niveles de anticuerpos anti quiméricos humanos (HACA) y de infliximab (IFX) en suero de paciente.

5 Antecedentes: La lista de bioterapéuticos basados en anticuerpos disponibles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y la artritis reumatoide (AR) se está incrementando constantemente. Sin embargo, determinados pacientes generarán anticuerpos antifármaco (AAF) que puede provocar un abanico de consecuencias, entre ellas la alteración de la farmacocinética del fármaco, una reducción/pérdida de la eficacia del fármaco y reacciones adversas del fármaco. El seguimiento de los pacientes para fármaco anticuerpo y niveles de AAF no sólo es un requisito de la FDA durante el proceso de desarrollo de un fármaco, sino que también resulta muy importante para un correcto control del paciente durante el tratamiento con estos fármacos. Se dispone de diferentes métodos para la evaluación de los niveles de AAF y de fármaco, incluyendo el inmunoensayo de fase sólida, radioinmunoprecipitación (RIPA) y resonancia del plasmón superficial (RPS). Sin embargo, se identifican muchas desventajas en estos métodos, incluyendo epítomos enmascarados/alterados por inmovilización del antígeno o marcaje, la incapacidad de definir la especificidad de especies y la detección de isotipo, el fracaso en la detección de anticuerpos de baja afinidad, la necesidad de instrumentos dedicados o reactivo marcado radioactivamente, y una baja tolerancia al fármaco presente en la muestra. Los presentes inventores han desarrollado un ensayo homogéneo de cambio de movilidad sin marcaje radioactivo en fase líquida para medir los niveles de HACA y de fármaco en suero de pacientes tratados con IFX. Este método supera muchas de las limitaciones de los métodos actuales de medición de HACA y del nivel de fármaco.

Métodos: para llevar a cabo el ensayo de cambio de movilidad de HACA, se incubó infliximab (IFX) marcado con AlexaFluor 488 (Alexa488) que contenía un control de carga de Alexa488, con suero positivo para HACA y se dejó que alcanzase el equilibrio. Tras el equilibrado, seguidamente la mezcla de reacción se inyectó en una columna de HPLC. Se resolvieron Alexa488-IFX libre y los complejos inmunológicos mediante cromatografía HPLC de exclusión por tamaño (CET) y se midió con un detector de fluorescencia (DFL) la intensidad de la fluorescencia de cada pico resuelto. Los cambios en la proporción entre el área del pico de Alexa488-IFX libre y el área del pico de Alexa488 control interno indican la cantidad de complejos inmunológicos formada. Se utilizaron diferentes diluciones de suero positivo para HACA para generar una curva estándar, que se ajustó a un modelo logístico de 5 parámetros para considerar la asimetría. Se calculó la cantidad de HACA en las muestras a partir de la curva estándar. Se utilizó una metodología y análisis similares para medir el nivel de IFX en el suero, excepto en que se utilizó TNF- α marcado con Alexa488 para unirse a IFX y se utilizó IFX purificado como el estándar. Los presentes inventores llevaron a cabo una validación completa del método tanto en los ensayos de HACA como de IFX, y compararon los resultados de ensayo de muestras clínicas con los obtenidos de los métodos ELISA.

Resultados: la validación del ensayo de cambio de movilidad de HACA reveló un límite inferior de cuantificación de 6,75 U/ml en muestras de suero, lo que es equivalente a 35,4 ng/ml, y este valor es inferior a las exigencias del sector (250 a 500 ng/ml). El intervalo lineal de cuantificación es de 6,75 a 150 U/ml. La determinación de la precisión intra-ensayo e inter-ensayo rindió un coeficiente de variación inferior a 15% y la precisión del ensayo era inferior al 20%. La tolerancia al fármaco IFX en el ensayo es de hasta 100 μ g/ml en el suero de ensayo. Los niveles terapéuticos de azatioprina (AZA) y metotrexato (MTX), presencia de factor reumatoide (774 IU/ml), niveles normales de inmunoglobulinas, los TNF y los receptores solubles de TNF, no presentaron ninguna interferencia significativa en el ensayo. Se sometieron a ensayo muestras de ensayo de 100 sujetos sanos no expuestos a fármaco para fijar el punto de corte de 6,75 U/ml (media \pm 1,65SD). También se evaluaron cien muestras de suero positivas para HACA mediante ELISA de puente utilizando el ensayo de cambio de movilidad. Globalmente existe una fuerte correlación entre los dos métodos para determinar los niveles de HACA (Rho de Spearman=0,337, p=0,0196). Sin embargo, el nuevo método fue capaz de identificar 23 muestras falsamente positivas del ELISA de puente. Se obtuvieron resultados similares de la validación del ensayo de cambio de movilidad de IFX.

50 Conclusiones: los resultados del presente estudio demuestran la superioridad del ensayo de cambio de movilidad al medir HACA e IFX en las muestras de suero de paciente. Este método también puede aplicarse a la detección de otros biofarmacéuticos y AAF en muestras de suero de pacientes, tales como los tratados con adalimumab.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia o el nivel de un autoanticuerpo contra un fármaco anti-TNF- α en una muestra sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, comprendiendo el método:
 - (a) poner en contacto la muestra con un ácido para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α , en el que la muestra presenta o se sospecha que presenta un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α ,
 - (b) poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado tras la disociación de los complejos preformados, en el que opcionalmente la etapa (b) comprende además poner en contacto un control interno marcado con la muestra,
 - (c) neutralizar el ácido en la muestra para formar complejos marcados del fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo,
 - (d) someter los complejos marcados a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los complejos marcados, y
 - (e) detectar los complejos marcados, detectando de esta manera la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra.
2. Método según la reivindicación 2, en el que la muestra se pone en contacto con un ácido a una concentración de entre 0,1 M y 5 M.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el ácido se neutraliza mediante la adición de uno o más agentes neutralizadores a la muestra.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra se obtiene de un sujeto que recibe terapia con un fármaco anti-TNF- α .
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los complejos se eluyen en primer lugar, seguido de fármaco anti-TNF- α marcado libre.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fármaco anti-TNF- α se marca con un fluorofóro o un pigmento fluorescente.
7. Método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad de un fármaco anti-TNF- α en un sujeto que recibe un curso de terapia con el fármaco anti-TNF- α , comprendiendo el método:
 - (a) detectar la presencia o el nivel de un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α en una muestra del sujeto sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, comprendiendo el método:
 - (i) poner en contacto la muestra con un ácido para disociar los complejos preformados del autoanticuerpo y el fármaco anti-TNF- α , en el que la muestra presenta o se sospecha que presenta un autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α ,
 - (ii) poner en contacto la muestra con un fármaco anti-TNF- α marcado tras la disociación de los complejos preformados,
 - (iii) neutralizar el ácido en la muestra para formar complejos marcados del fármaco anti-TNF- α marcado y el autoanticuerpo,
 - (iv) someter los complejos marcados a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los complejos marcados, y
 - (v) detectar los complejos marcados, detectando de esta manera la presencia o el nivel del autoanticuerpo sin interferencia del fármaco anti-TNF- α en la muestra, y
 - (b) determinar una dosis posterior del curso de terapia para el sujeto o si debería administrarse un curso de terapia diferente en el sujeto basándose en la presencia o el nivel del autoanticuerpo, optimizando de esta manera la terapia y/o reduciendo la toxicidad del fármaco anti-TNF- α .
8. Método según la reivindicación 7, en el que la dosis posterior del curso de terapia se incrementa, se reduce o se mantiene basándose en la presencia o el nivel del autoanticuerpo.
9. Método según la reivindicación 7 ó 8, en el que el diferente curso de terapia puede comprender un fármaco anti-TNF- α diferente, o en el que el diferente curso de terapia comprende el curso de terapia actual conjuntamente con un agente inmunosupresor, o en el que el diferente curso de terapia comprende cambiar a un curso de terapia que no sea de un fármaco anti-TNF- α .
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fármaco anti-TNF- α se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, CNTO 148 y combinaciones de los mismos.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el autoanticuerpo contra el fármaco anti-TNF- α puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de un anticuerpo humano antiquimérico (HACA), un anticuerpo humano antihumanizado (HAHA), un anticuerpo humano antiratón (HAMA) y combinaciones de los mismos.
- 5
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ácido puede comprender un ácido orgánico, un ácido inorgánico, o mezclas de los mismos, en el que opcionalmente el ácido orgánico comprende ácido cítrico.
- 10
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la presencia o el nivel del autoanticuerpo se detecta en presencia de un nivel elevado del fármaco anti-TNF- α , en el que opcionalmente el nivel elevado del fármaco anti-TNF- α corresponde a un nivel de fármaco anti-TNF- α de entre 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$.
- 15
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la cromatografía de exclusión por tamaño es cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (HPLC-ET).
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la muestra es suero.

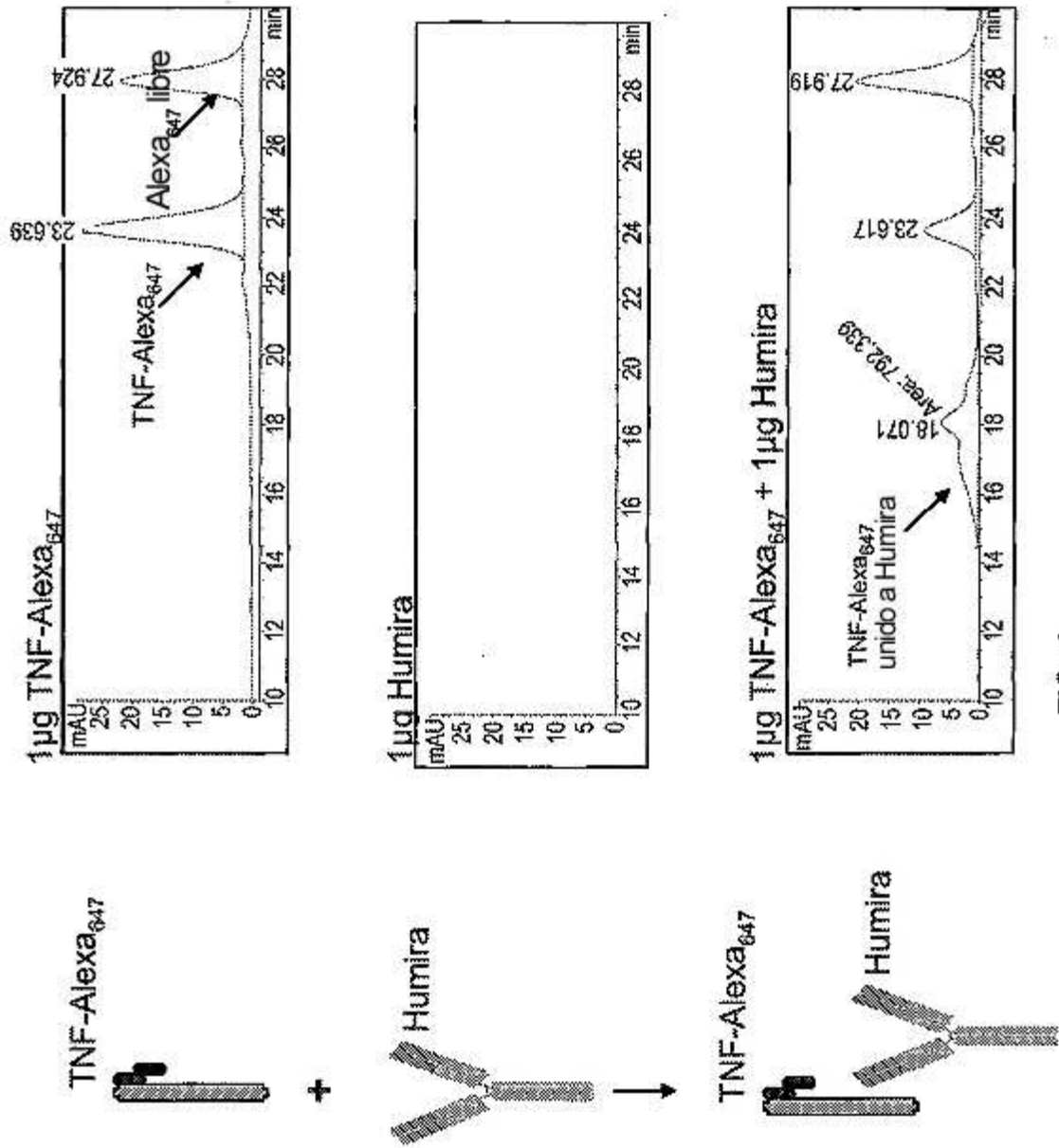


FIG. 1

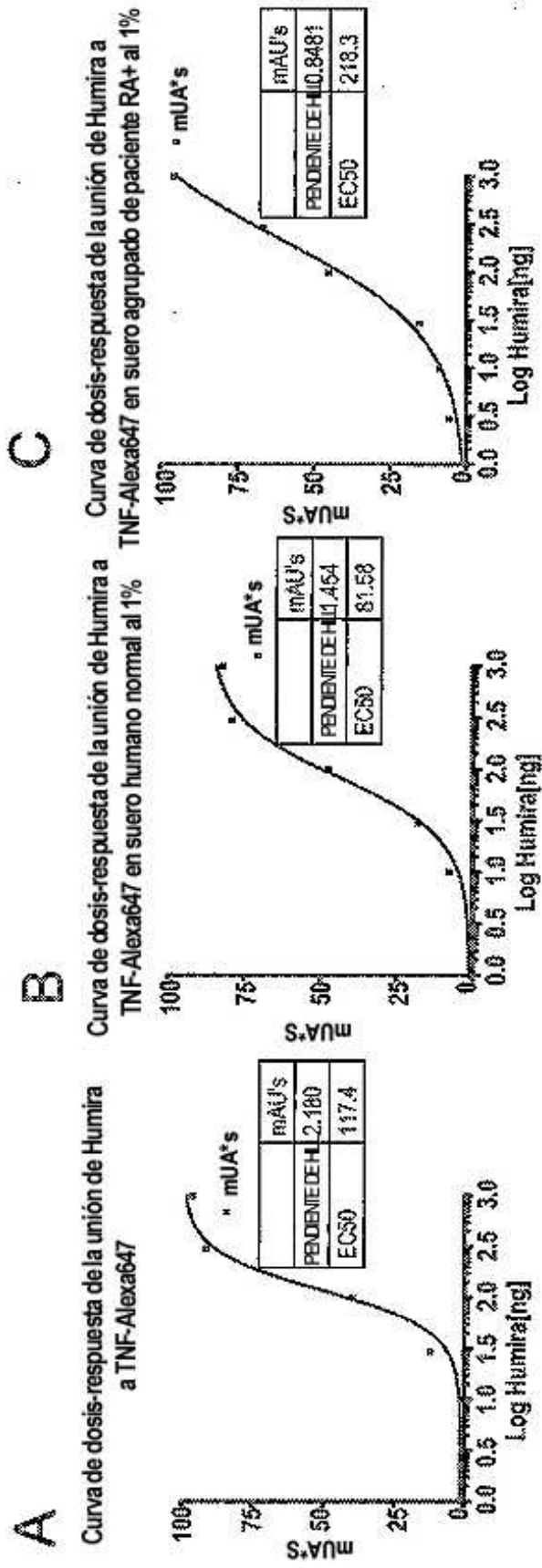


FIG. 2

Ensayo de puente:

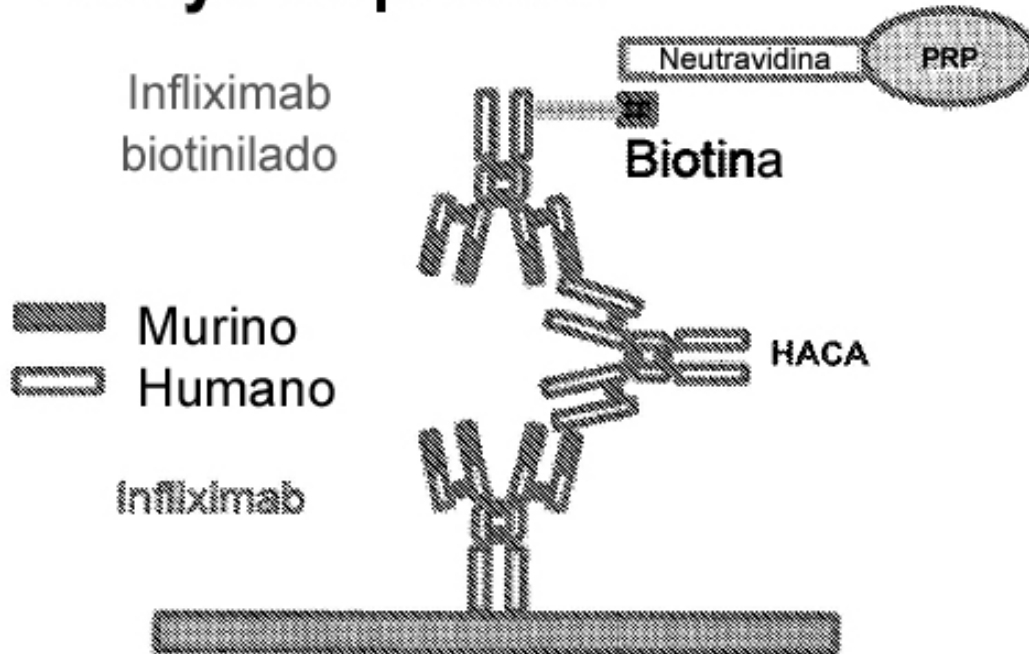


FIG. 3

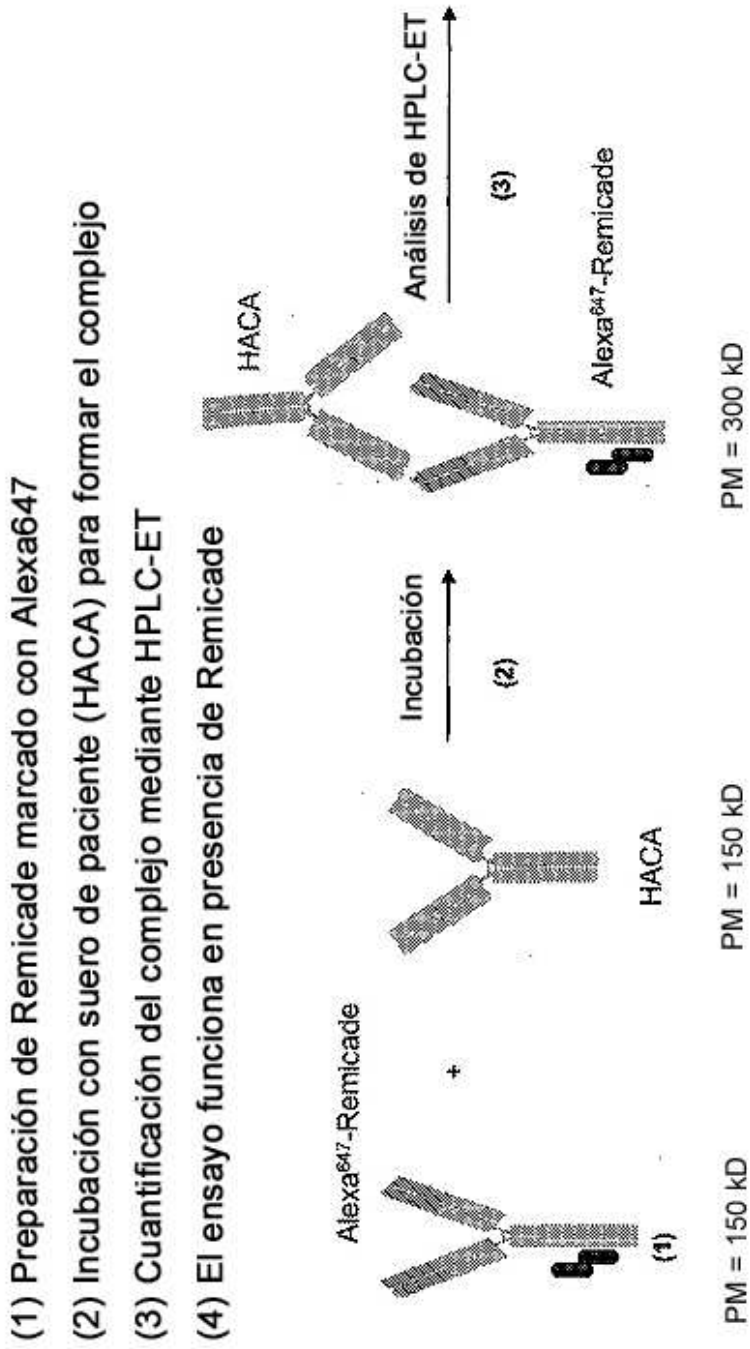


FIG. 4

1

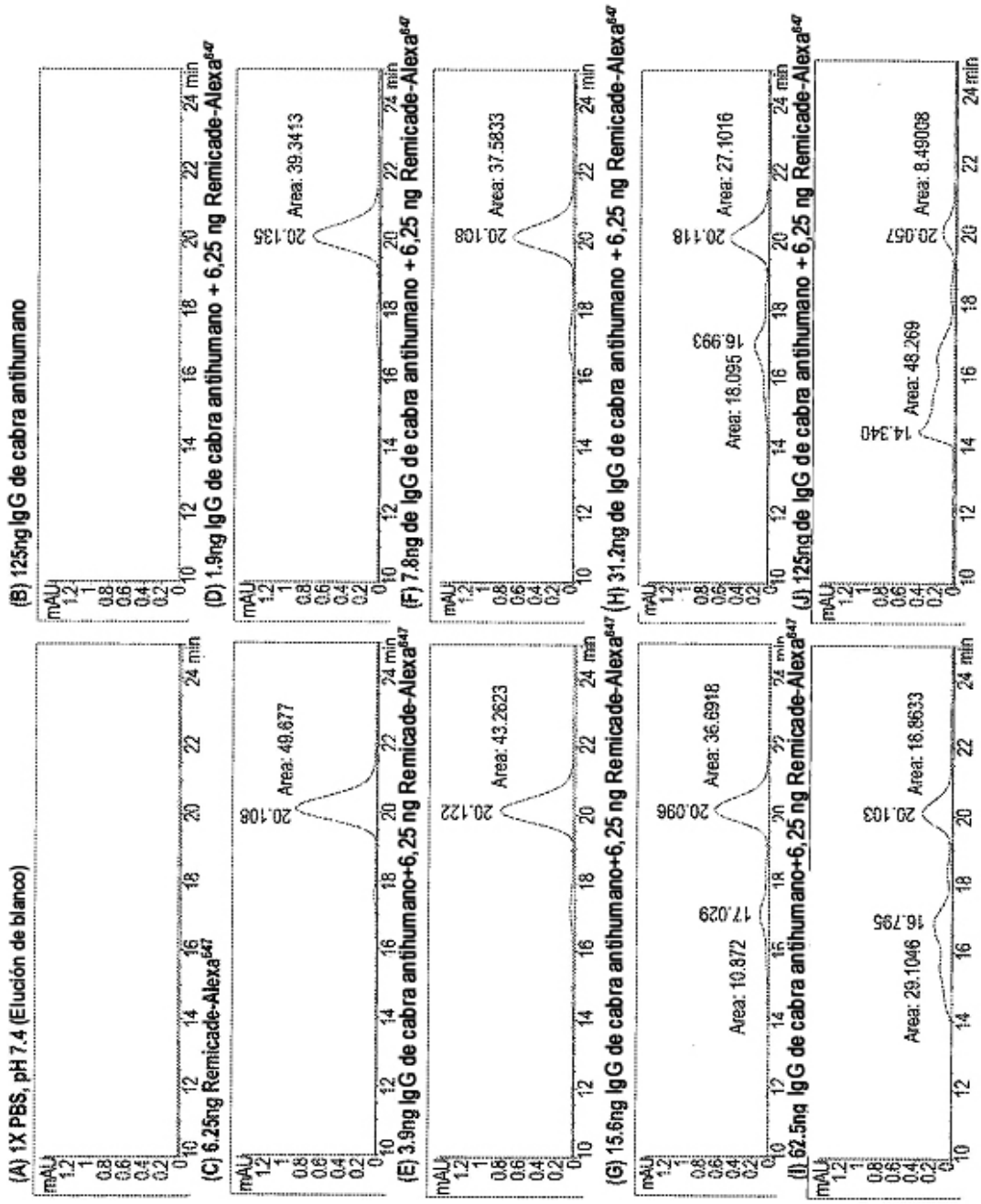


FIG. 5

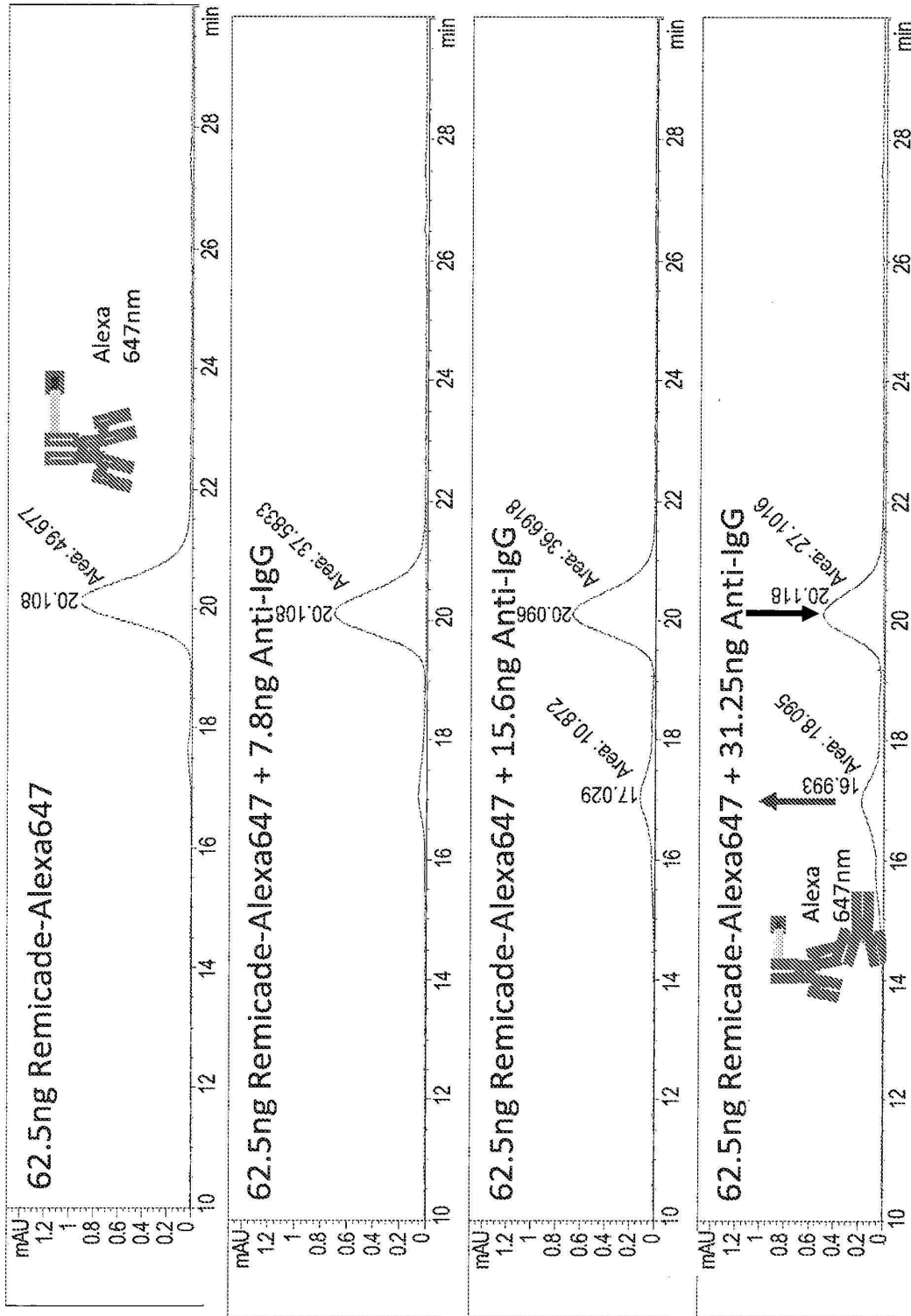
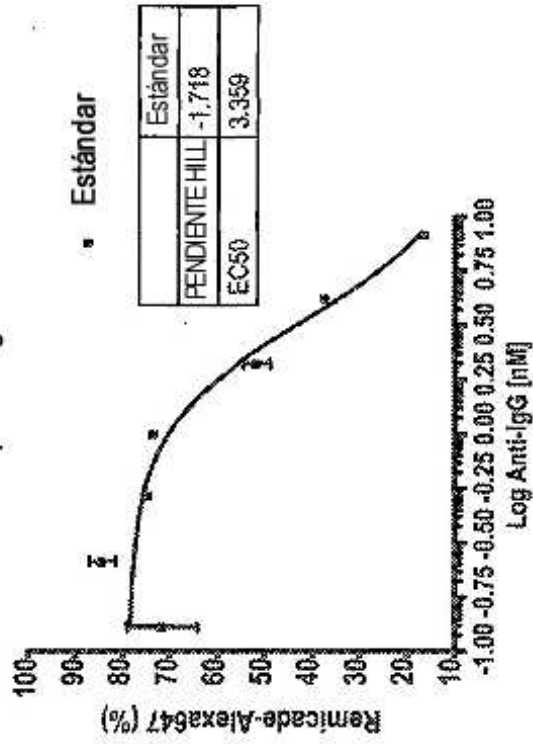


FIG. 6

A.

Curva de dosis-respuesta de Remicade-Alexa647 restante tras la incubación con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-IgG humano



B.

Respuesta de dosis de complejo de Remicade-Alexa647 en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-IgG humano

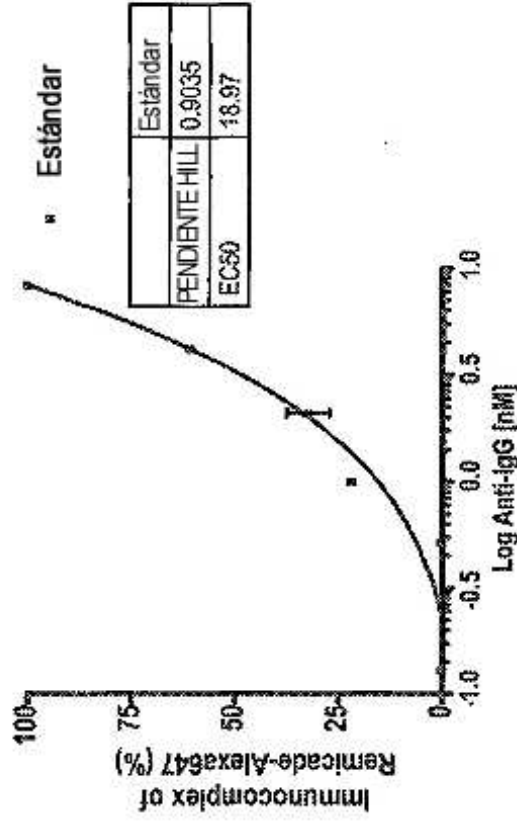


FIG. 7

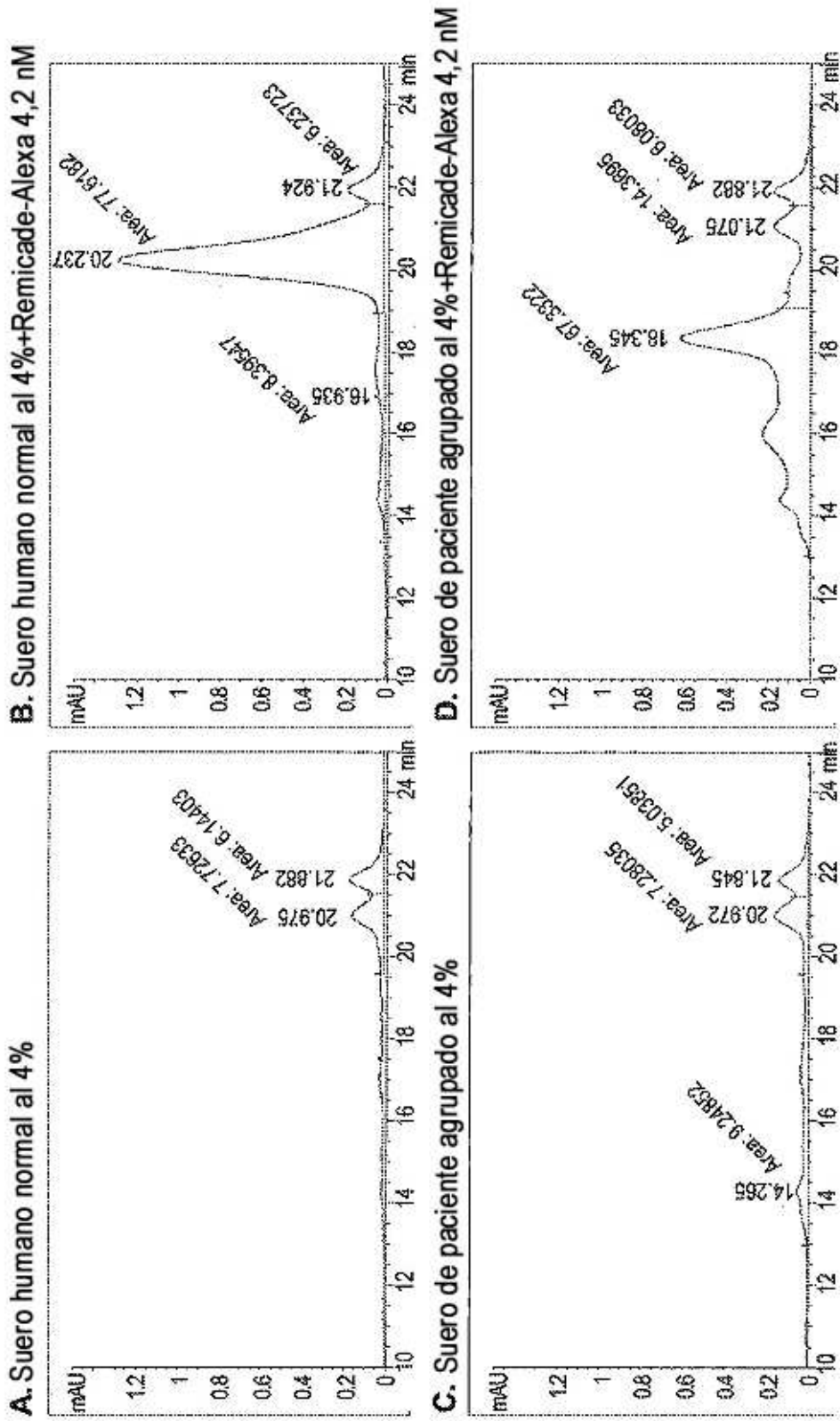


FIG. 8

N° de acceso	ELISA de puente		Ensayo de cambio de movilidad (suero al 4%)		
	Resultado cuantitativo	Resultado cualitativo	Ensayo de cambio de HACA	HACA Area/Remicade-647 Area	Remicade (nM)
SK07010477	22.26	Positivo	Positivo	0.78	3.33
SK07060985	1.47	Negativo	Negativo	0.1	4.06
SK07070663	1.47	Negativo	Negativo	0.1	8.87
SK07070905	4.1	Negativo	Positivo	0.46	7.34
SK07070995	1.47	Negativo	Positivo	0.25	8.36
SK07071213	2.48	Positivo	Positivo	0.16	5.30
SK07081127	22.07	Positivo	Positivo	0.28	3.00
SK07100135	1.47	Negativo	Positivo	0.18	>55.7
SK07141447	2.62	Positivo	Positivo	0.42	2.43
SK07171059	10.11	Positivo	Positivo	18.02	2.59
SK07171095	10.03	Positivo	Positivo	0.24	2.24
SK07210210	9.26	Positivo	Positivo	0.8	<0.67
SK07231216	25.58	Positivo	Positivo	Cambio completo	1.34
SK07310149	2.74	Positivo	Positivo	0.21	<0.67
SK08040168	22.21	Positivo	Positivo	Cambio completo I	<0.67
SK08051035	9.72	Positivo	Positivo	5.7	1.89
SK08070307	2.49	Positivo	Positivo	0.23	3.14
SK08120222	9.2	Positivo	Positivo	0.25	<0.67
SK08260983	23.15	Positivo	Positivo	0.48	1.04
SK08260783	2.67	Positivo	Positivo	0.25	3.30
62.5ng Remicade - 647				0.12	
100ng TNF - 647					<0.67

FIG. 9

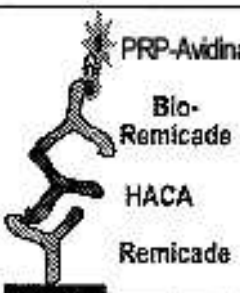
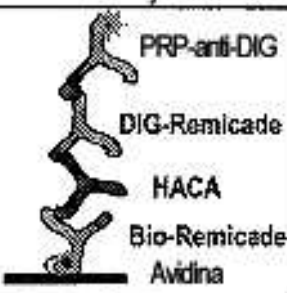
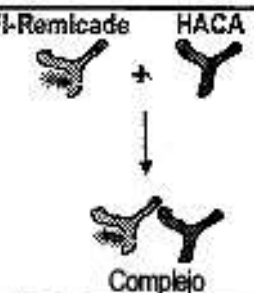
	Ensayo de puente de HACA	ELISA homogéneo de unión basado en biotina y DIG	Ensayo de HACA de la presente invención
Formato de ensayo	 <p>PRP-Avidina Bio-Remicade HACA Remicade</p>	 <p>PRP-anti-DIG DIG-Remicade HACA Bio-Remicade Avidina</p>	 <p>Fi-Remicade + HACA Complejo</p>
Interferencia de fondo no específica	Alto	Alto	Bajo
Sensibilidad	Bajo	Intermedio	Alto
Posibilidad de Falso-positivo y Falso-negativo	Alto	Alto	Bajo
Detección de HACA de IgG4	No	No	Si
Identificación de isotipo de Ig	No	No	Si
Tolerancia del fármaco en la muestra	Pobre	Pobre	Buena

FIG. 10

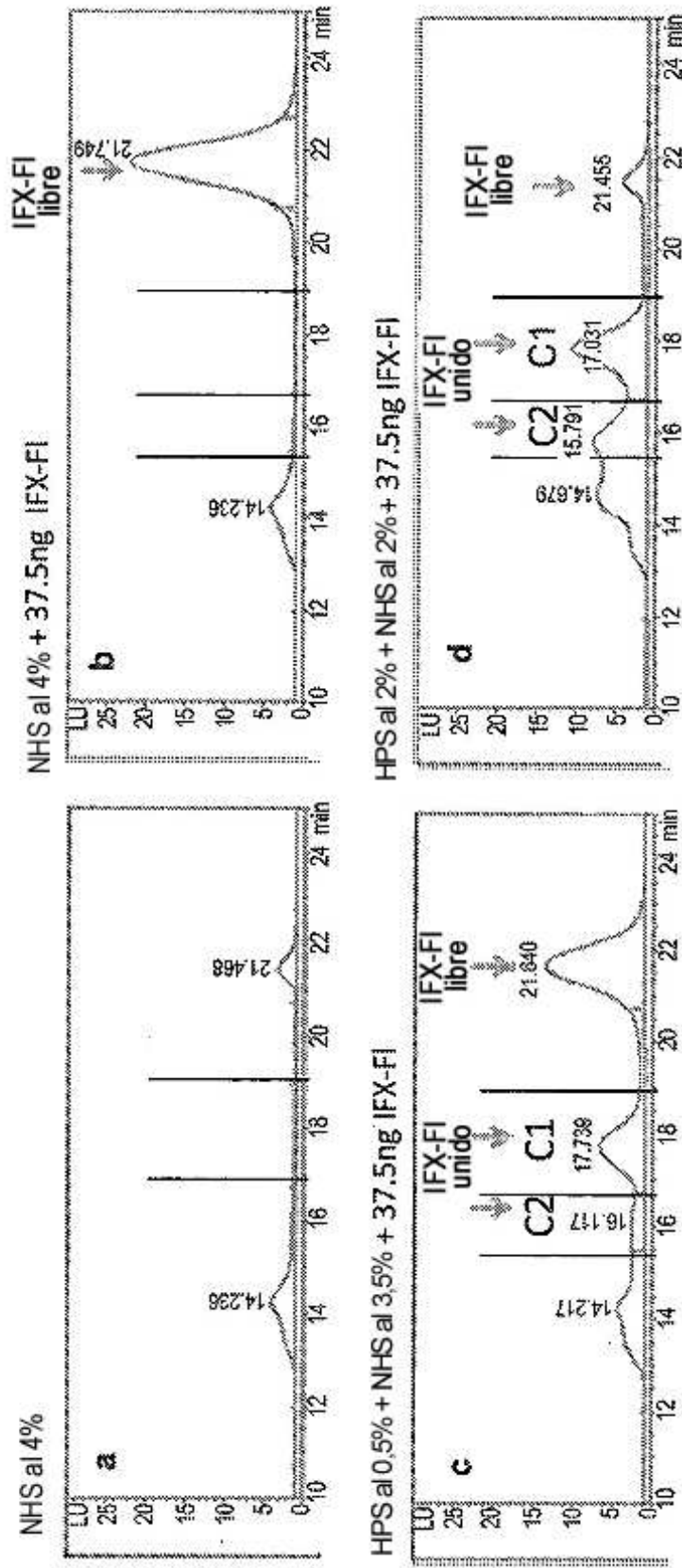


FIG. 11

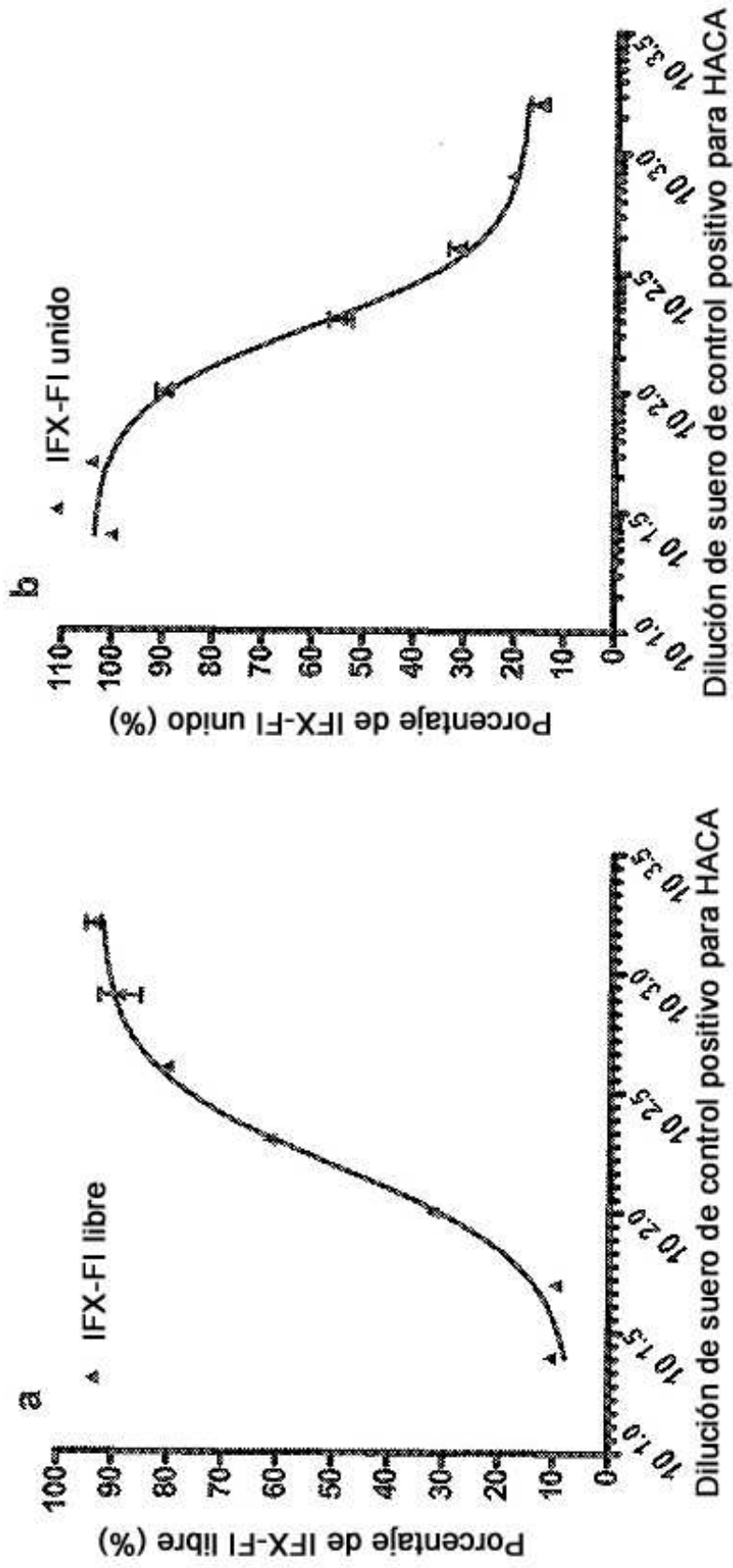


FIG. 12

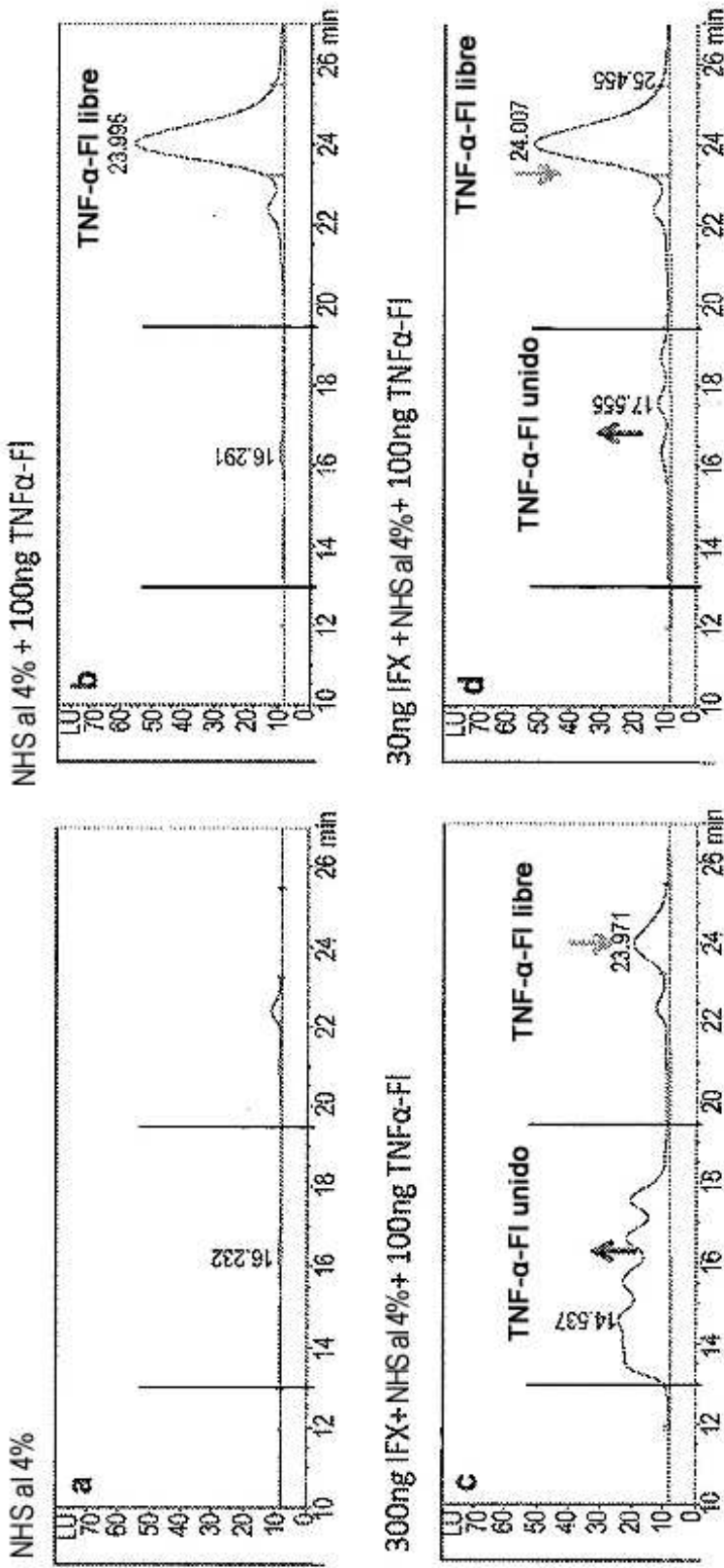


FIG. 13

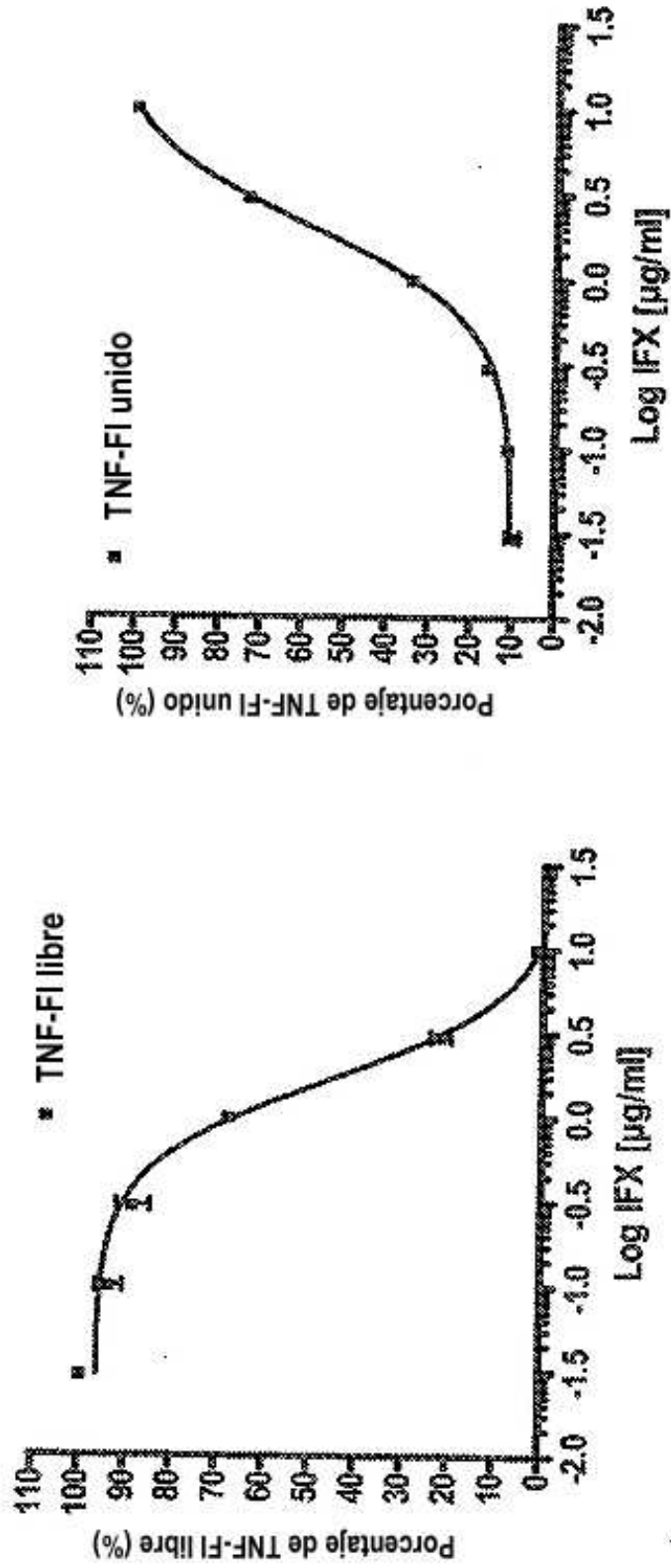


FIG. 14

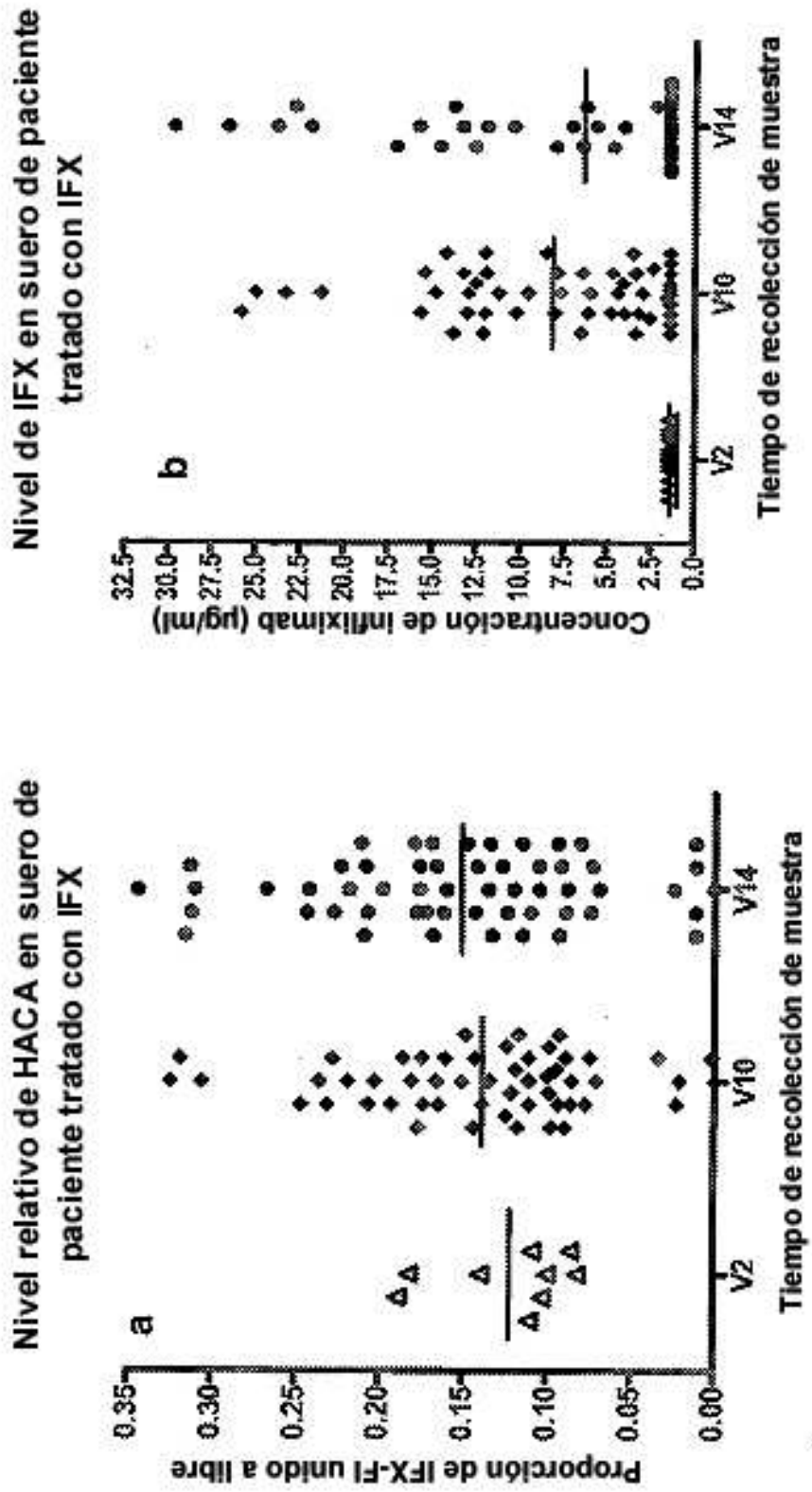


FIG. 15

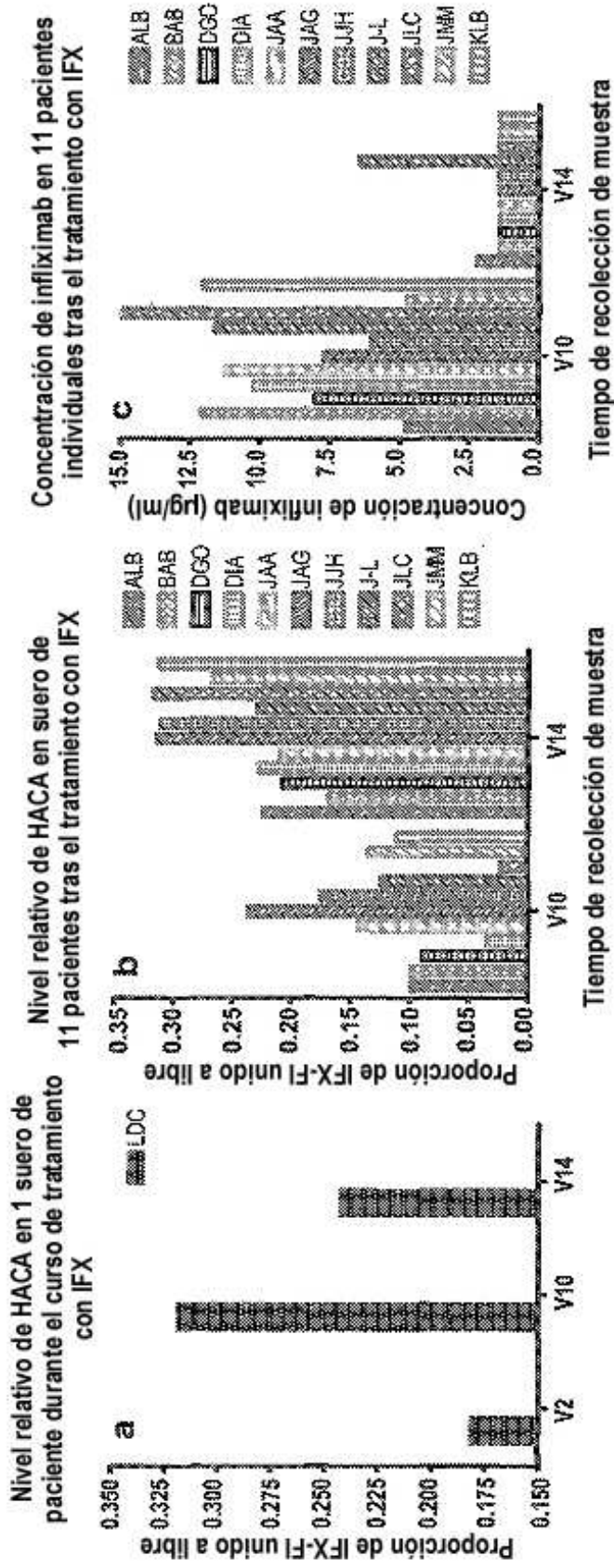
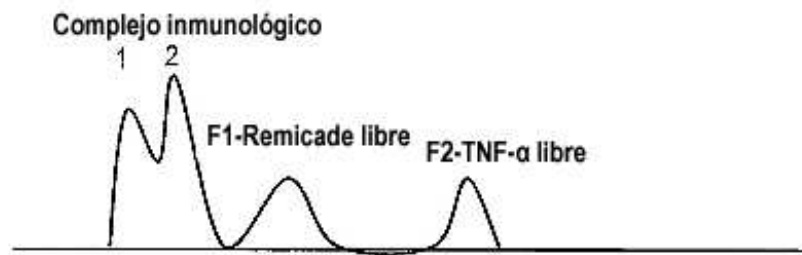
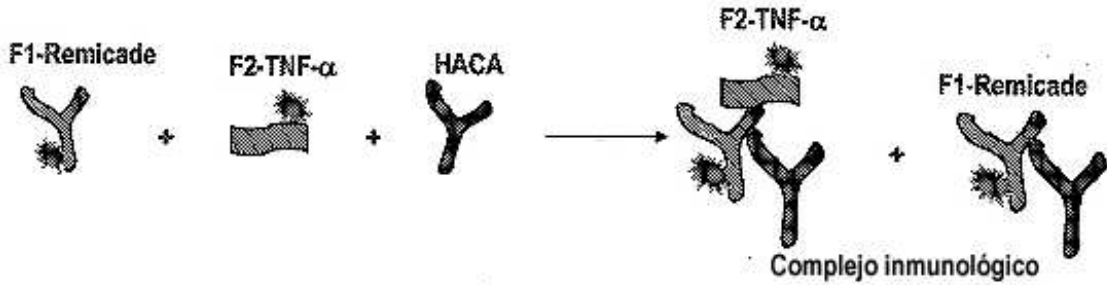


FIG. 16

A. Ensayo de HACA no neutralizador



B. Ensayo de HACA neutralizador

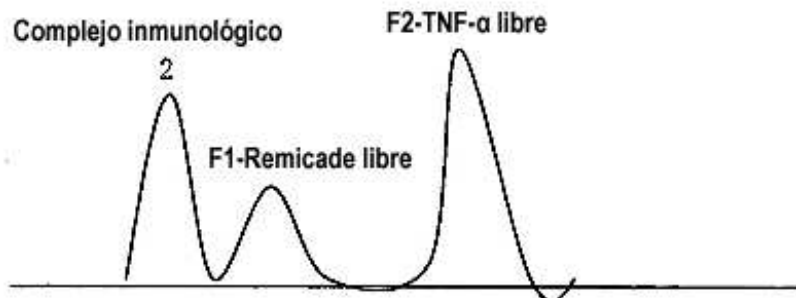
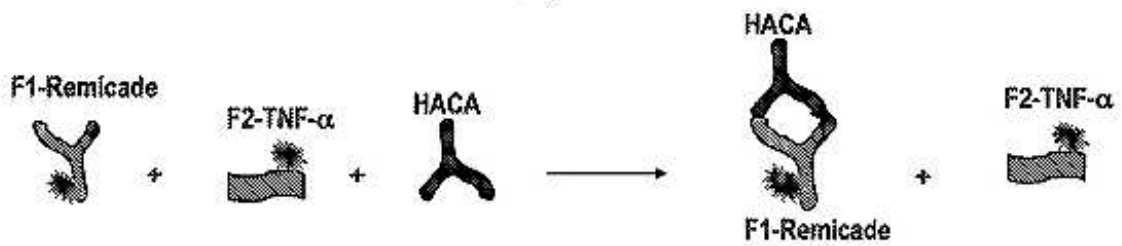


FIG. 17

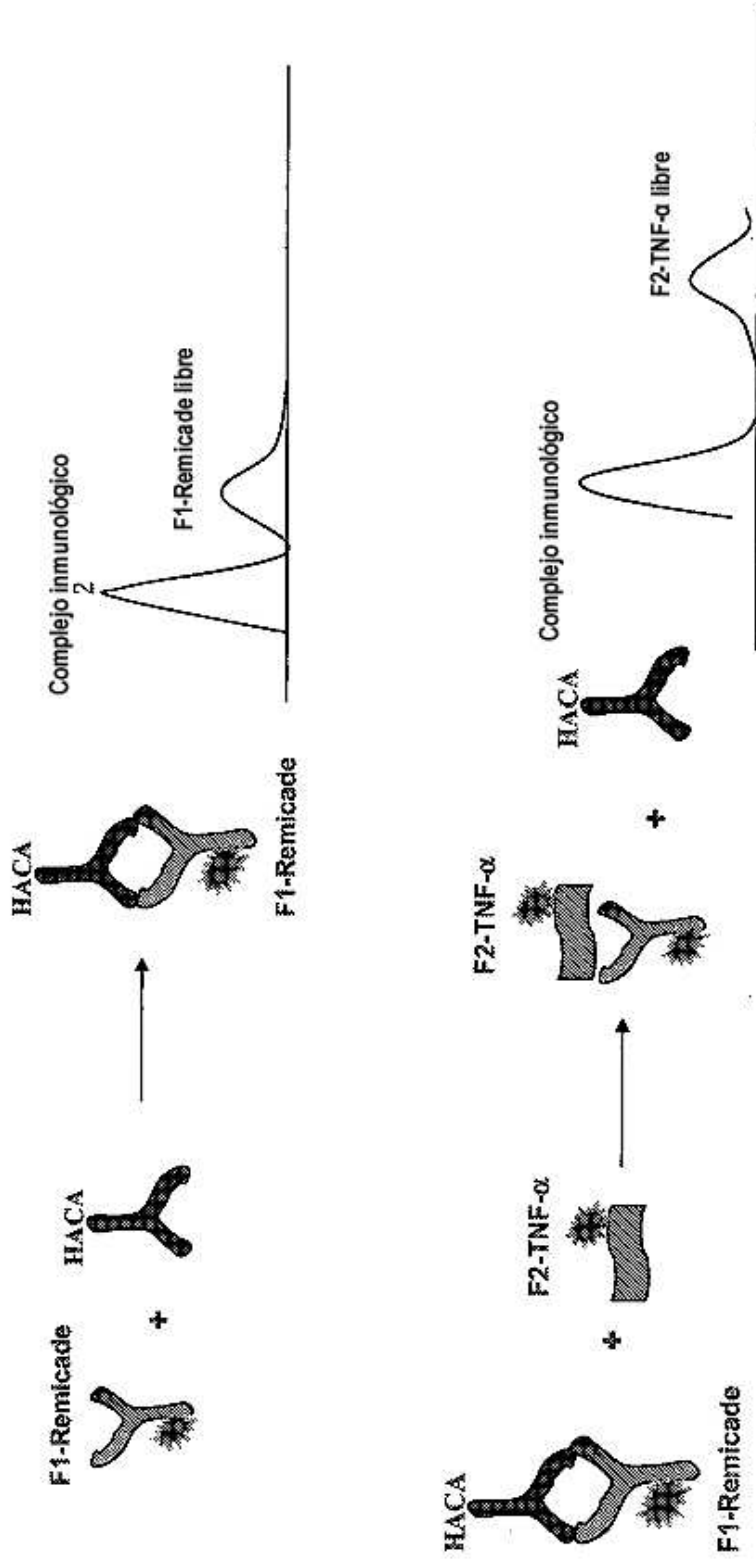


FIG. 18

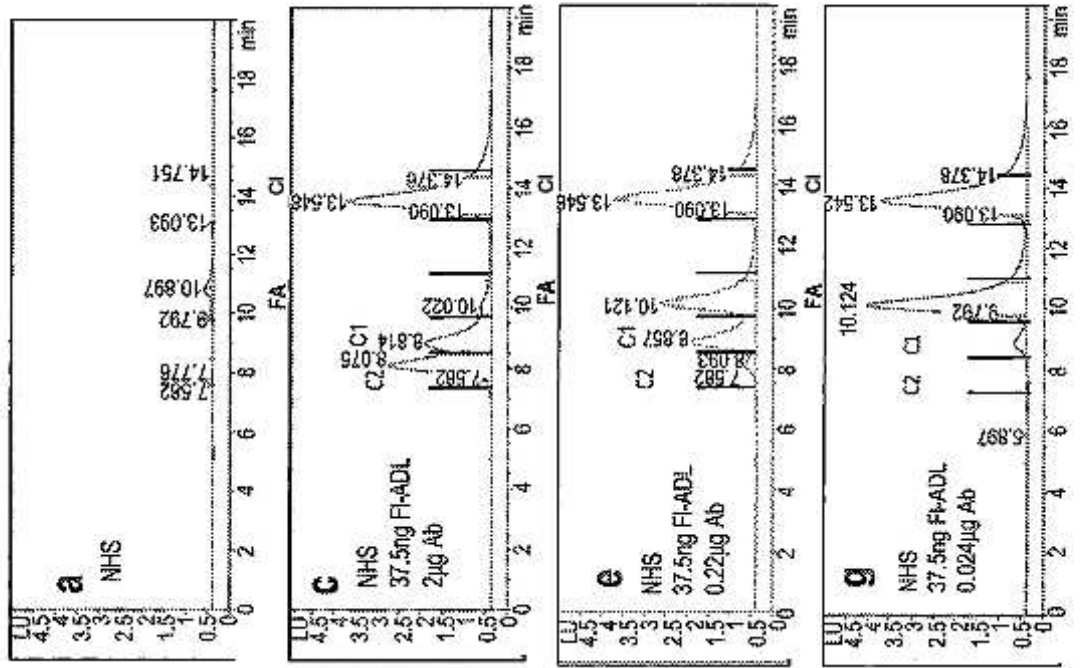
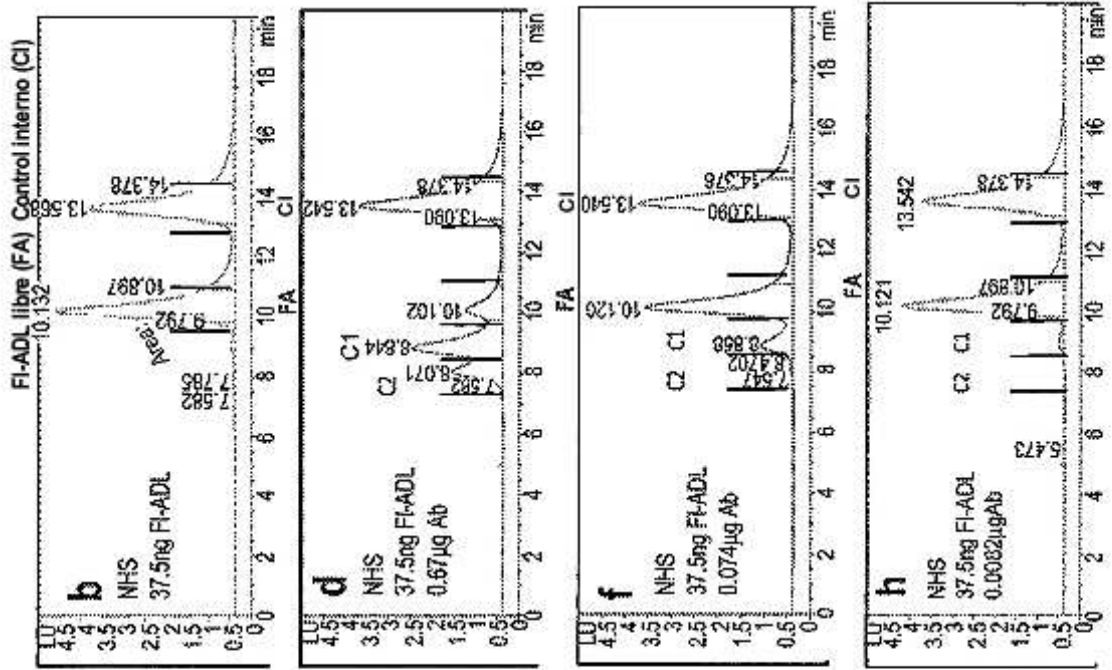


FIG. 19

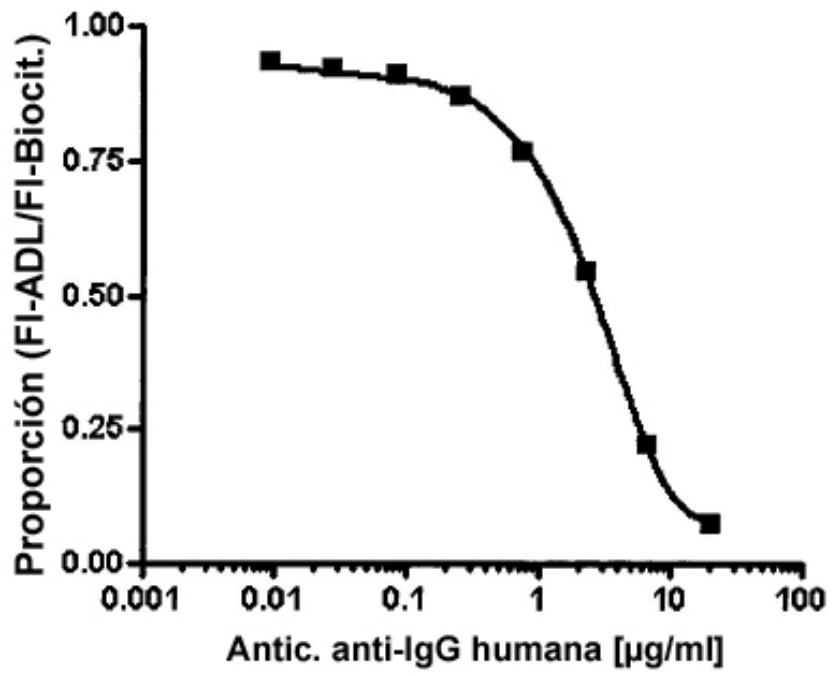


FIG. 20

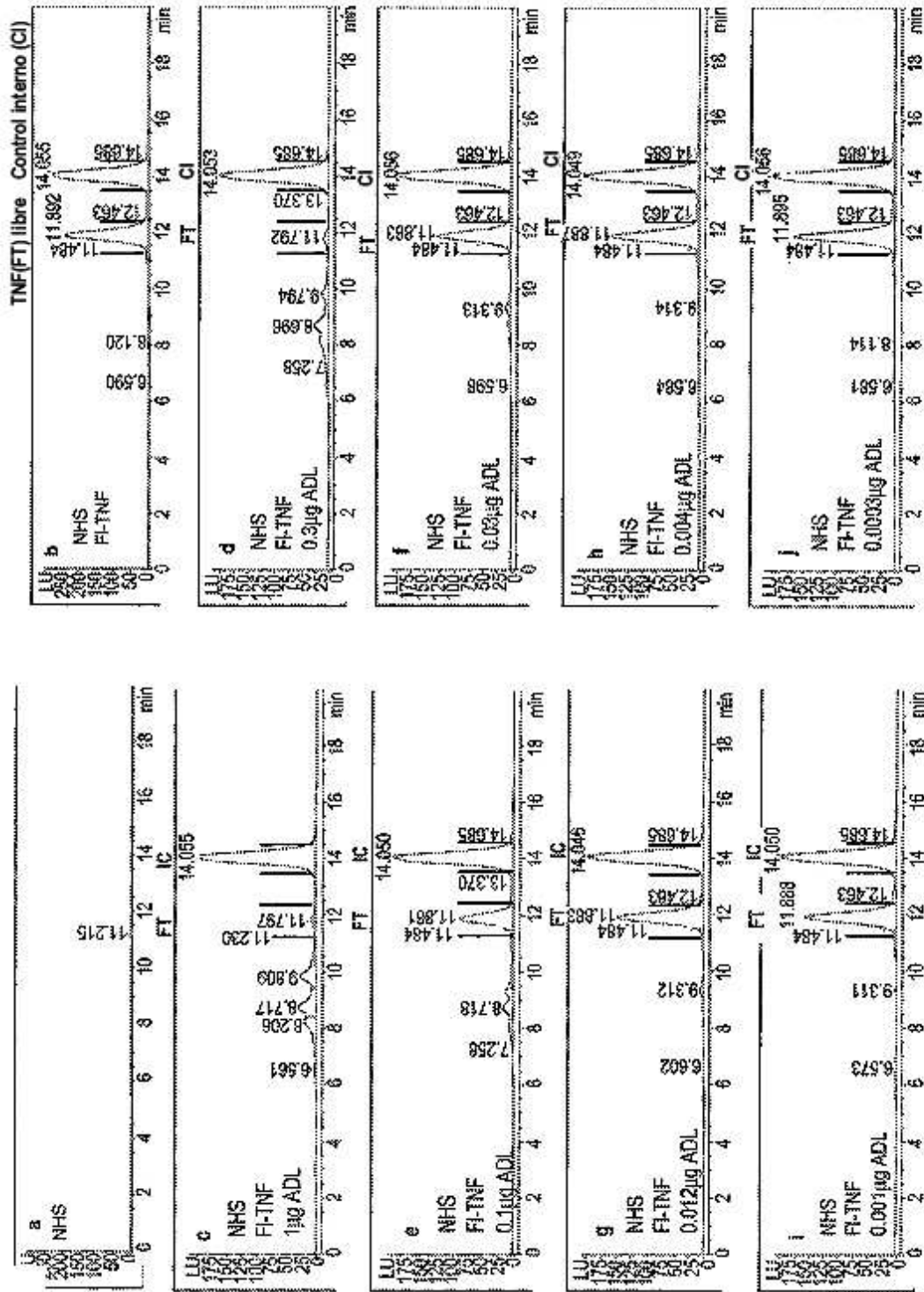
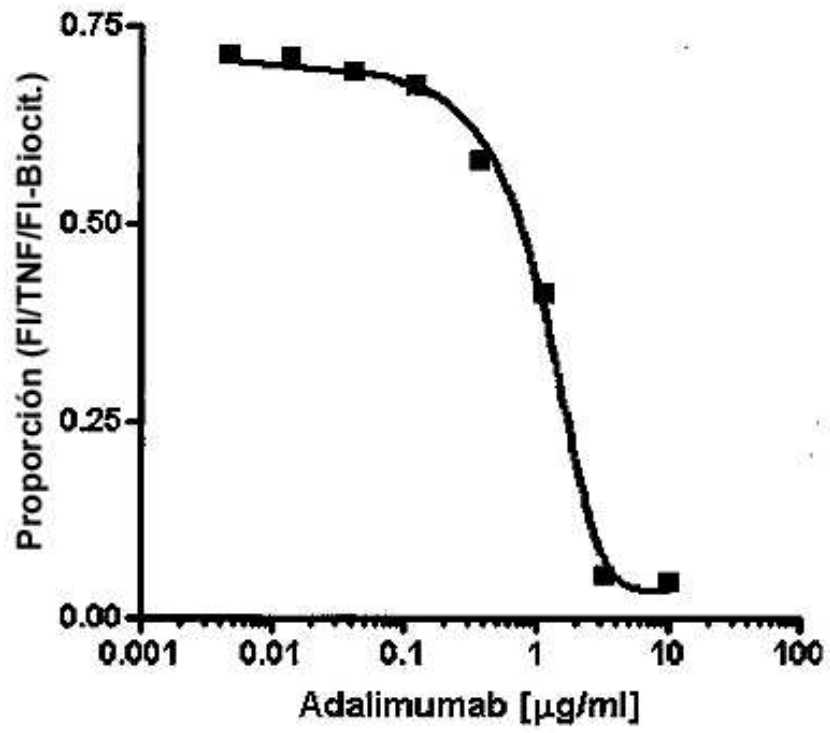


FIG. 21



PENDIENTEHILL	-1.813
EC50	1.213

FIG. 22

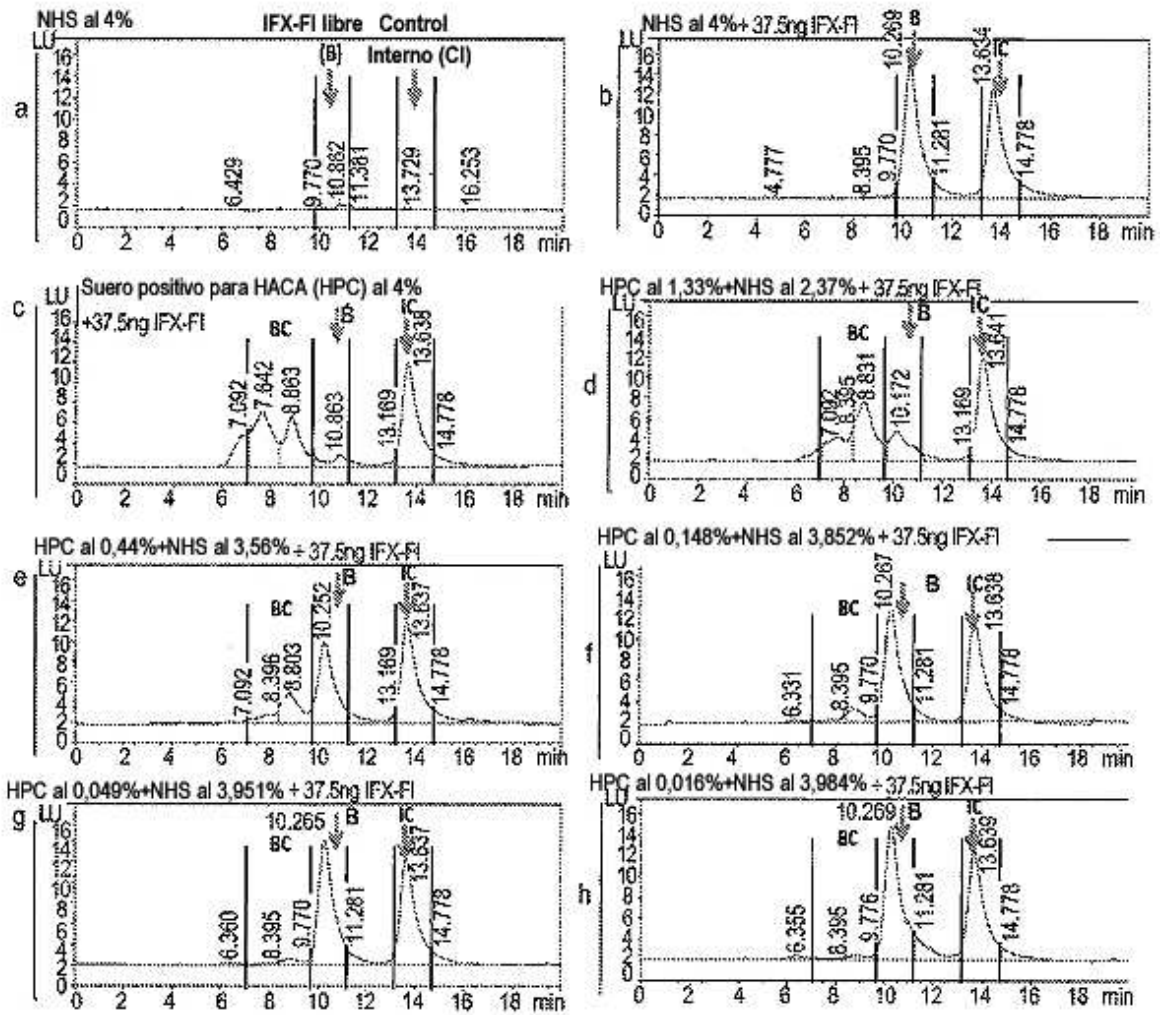


FIG. 23

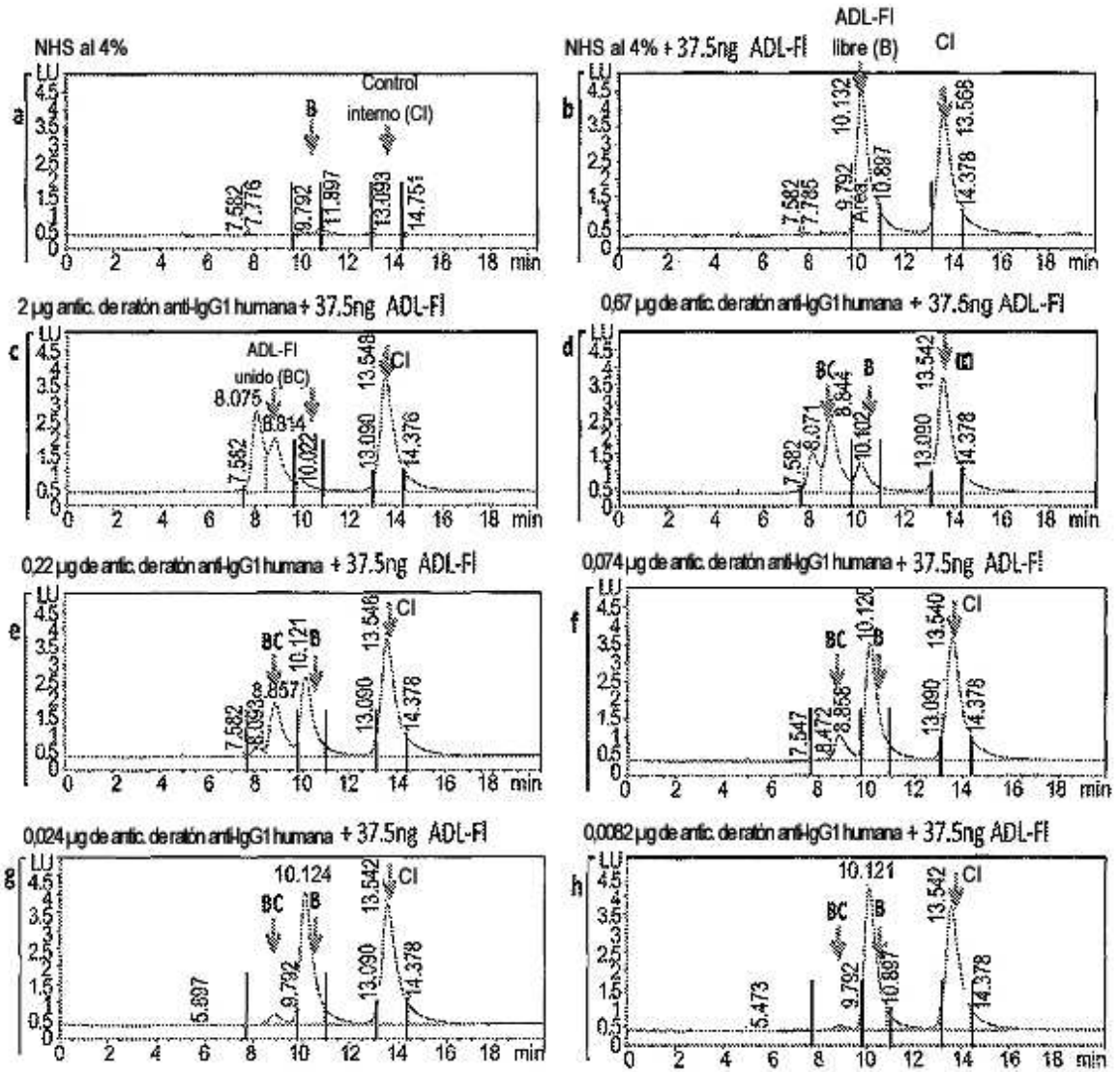


FIG. 24

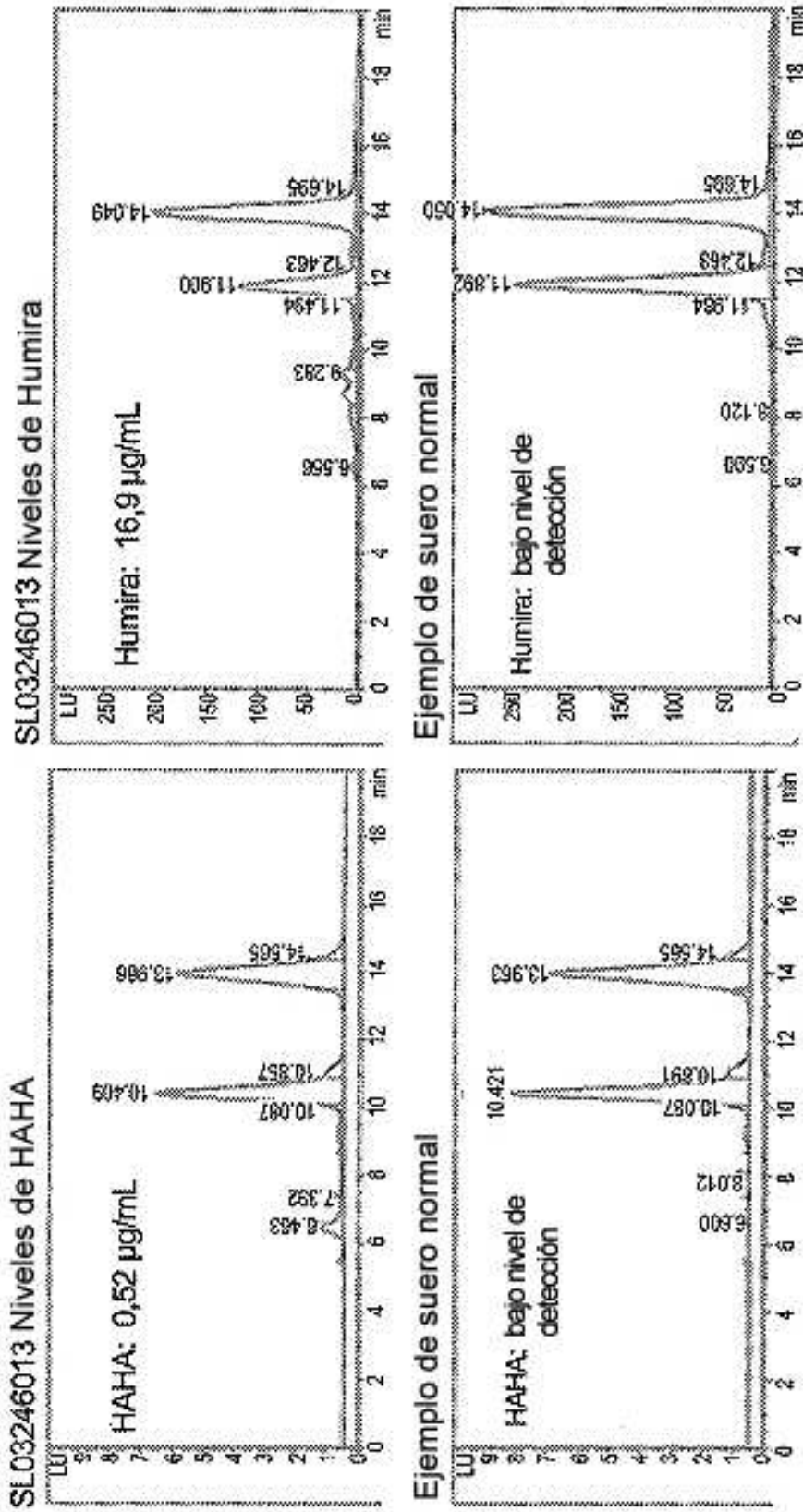


FIG. 25

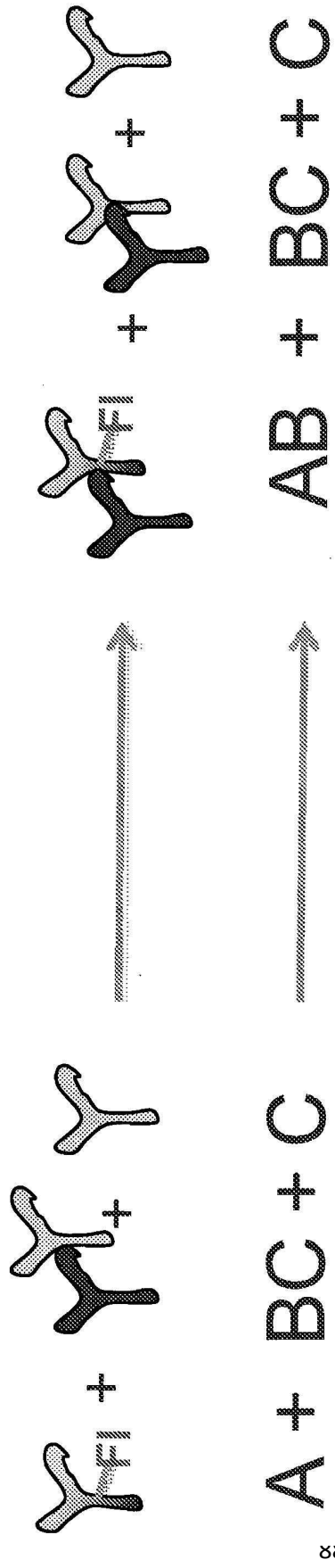


FIG. 26

Ensayo de HACA Interferencia de IFX

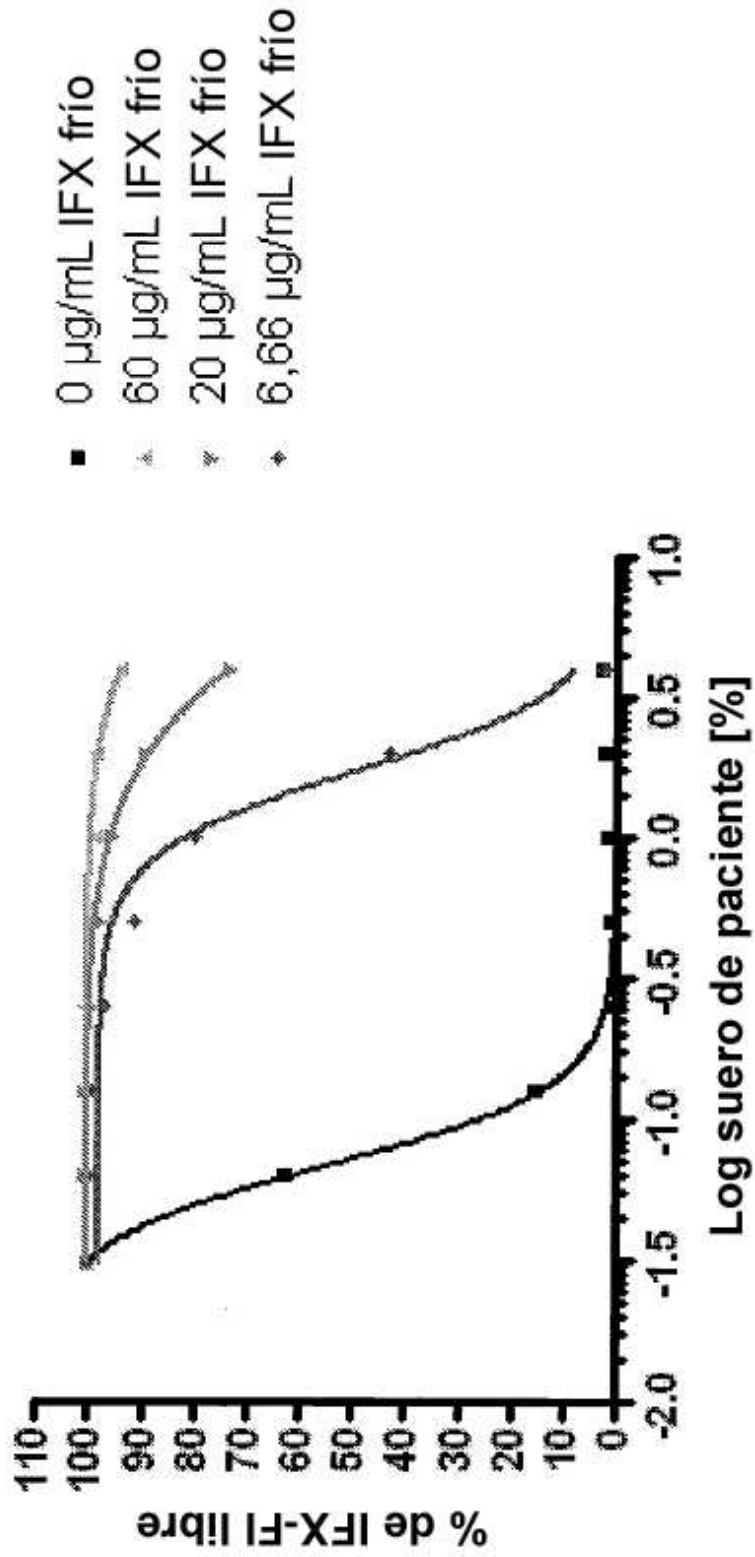


FIG. 27

Ensayo de HACA

Interferencia de IFX con disociación ácida

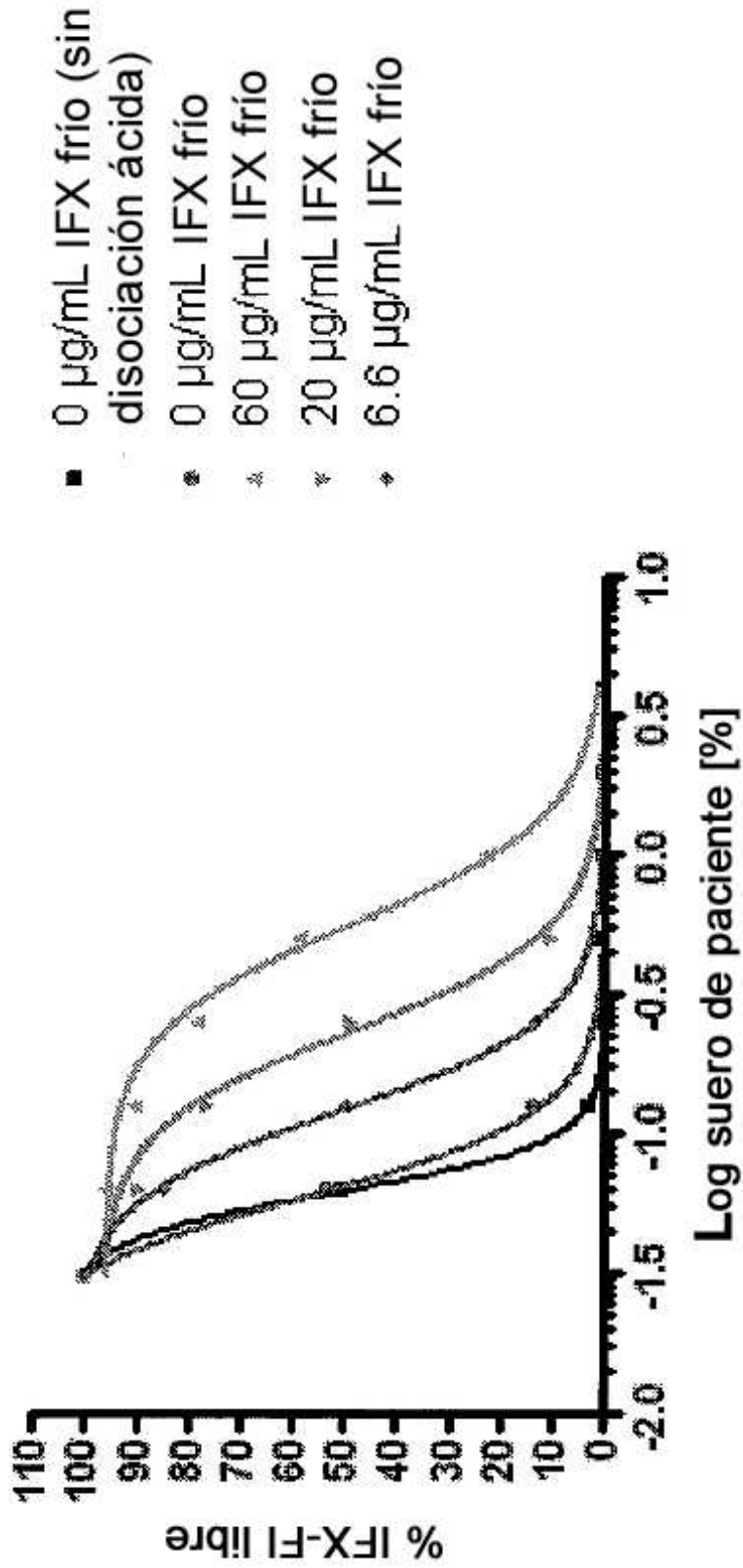


FIG. 28

Niveles séricos de IFX en paciente tratado con infliximab (dilución de muestra: 1:25)

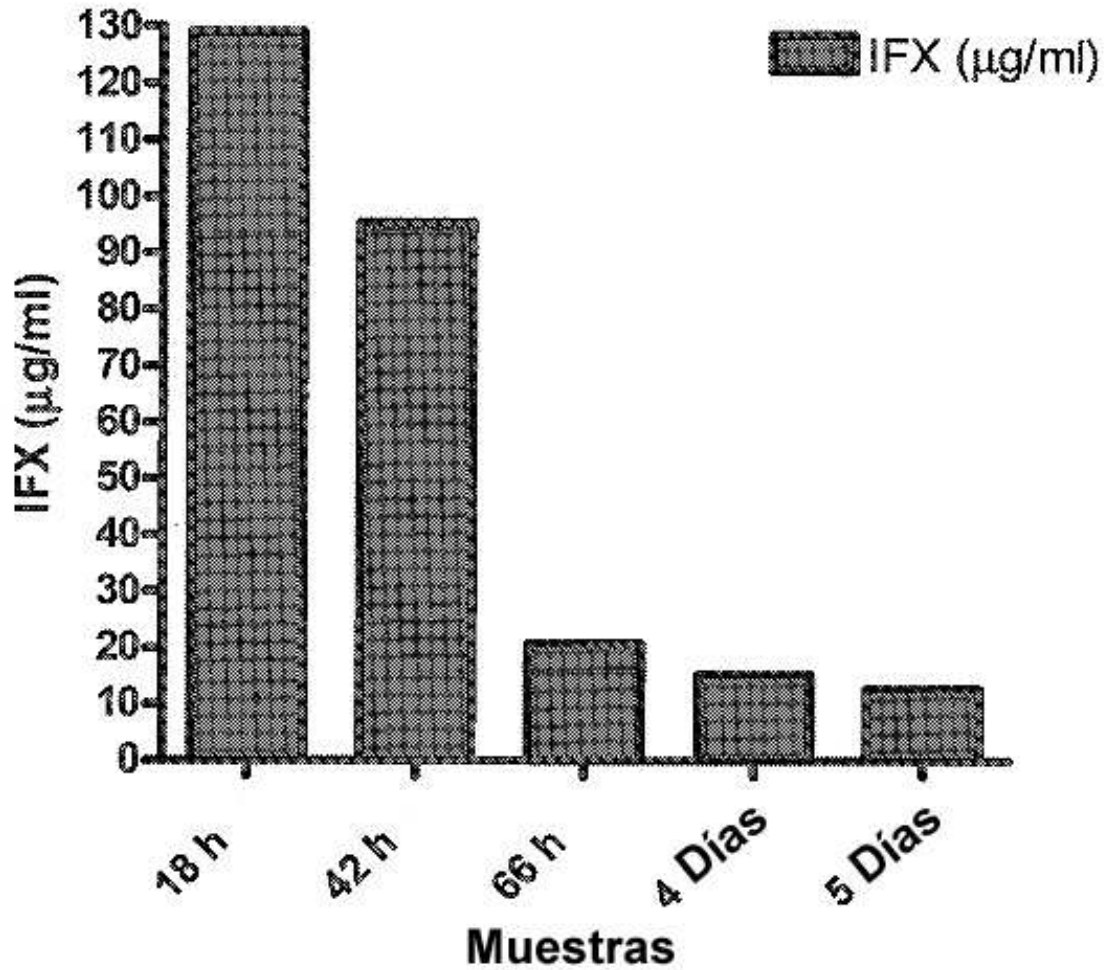


FIG. 29

Niveles séricos de IFX en paciente tratado con infliximab (dilución de muestra: 1:100)

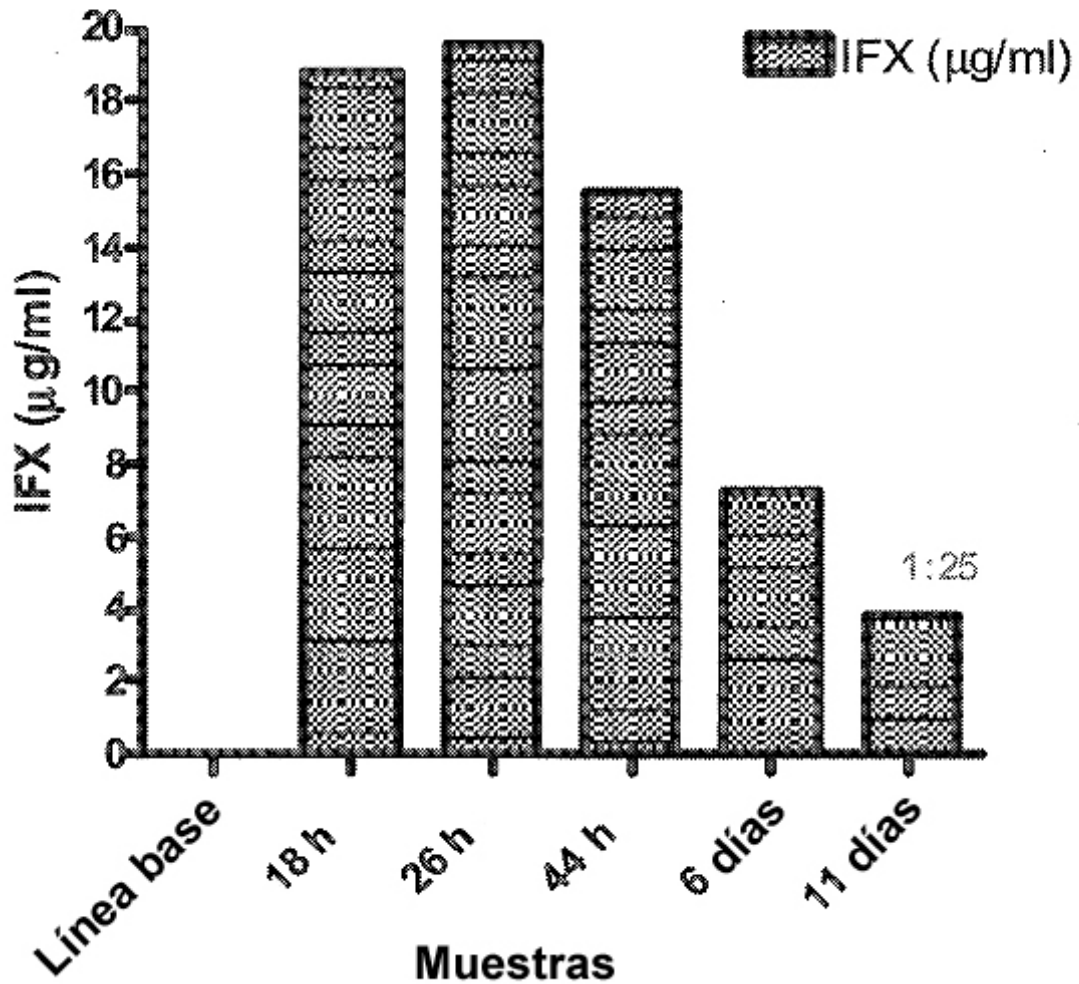


FIG. 30

Niveles séricos de TNF- α en paciente tratado con infliximab

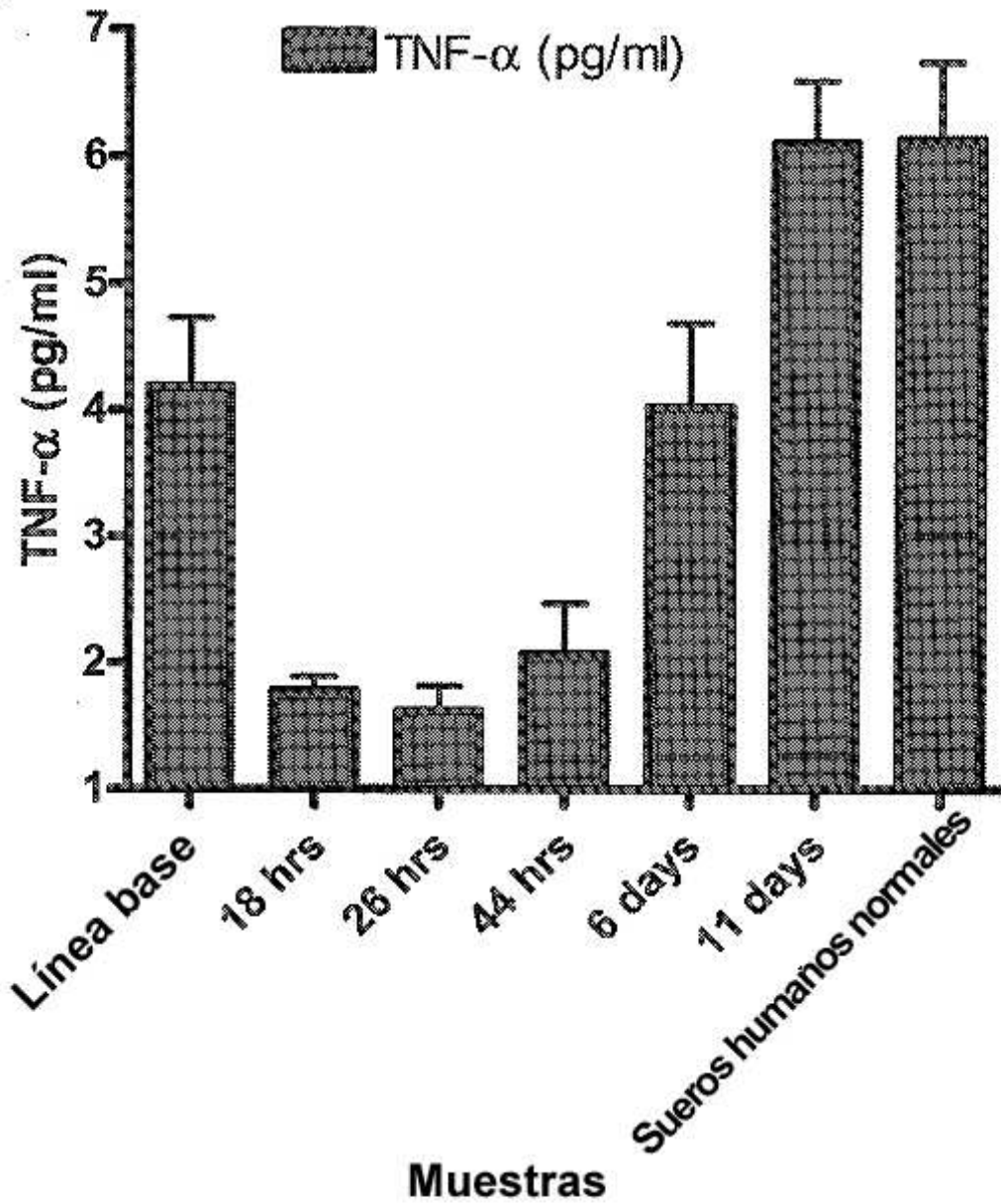
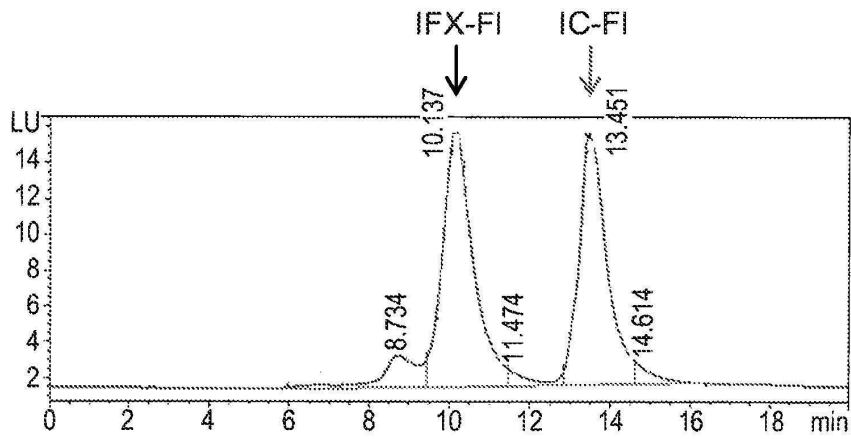
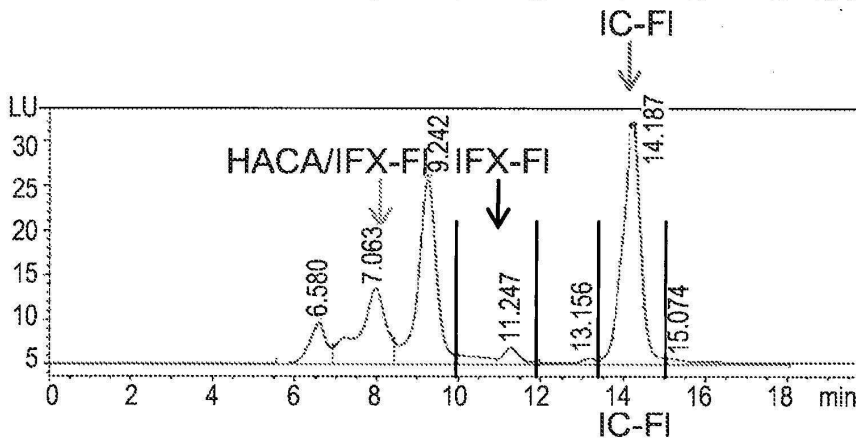


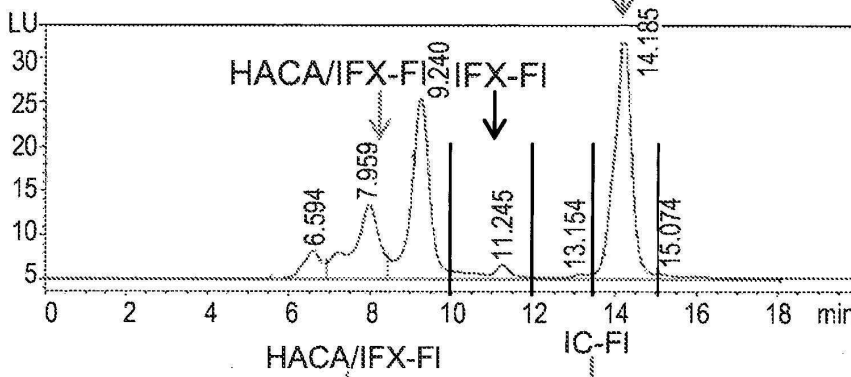
FIG. 31



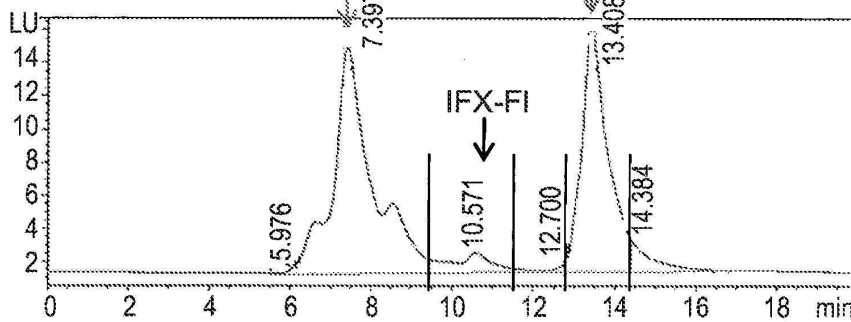
A



B



C



D

FIG. 32

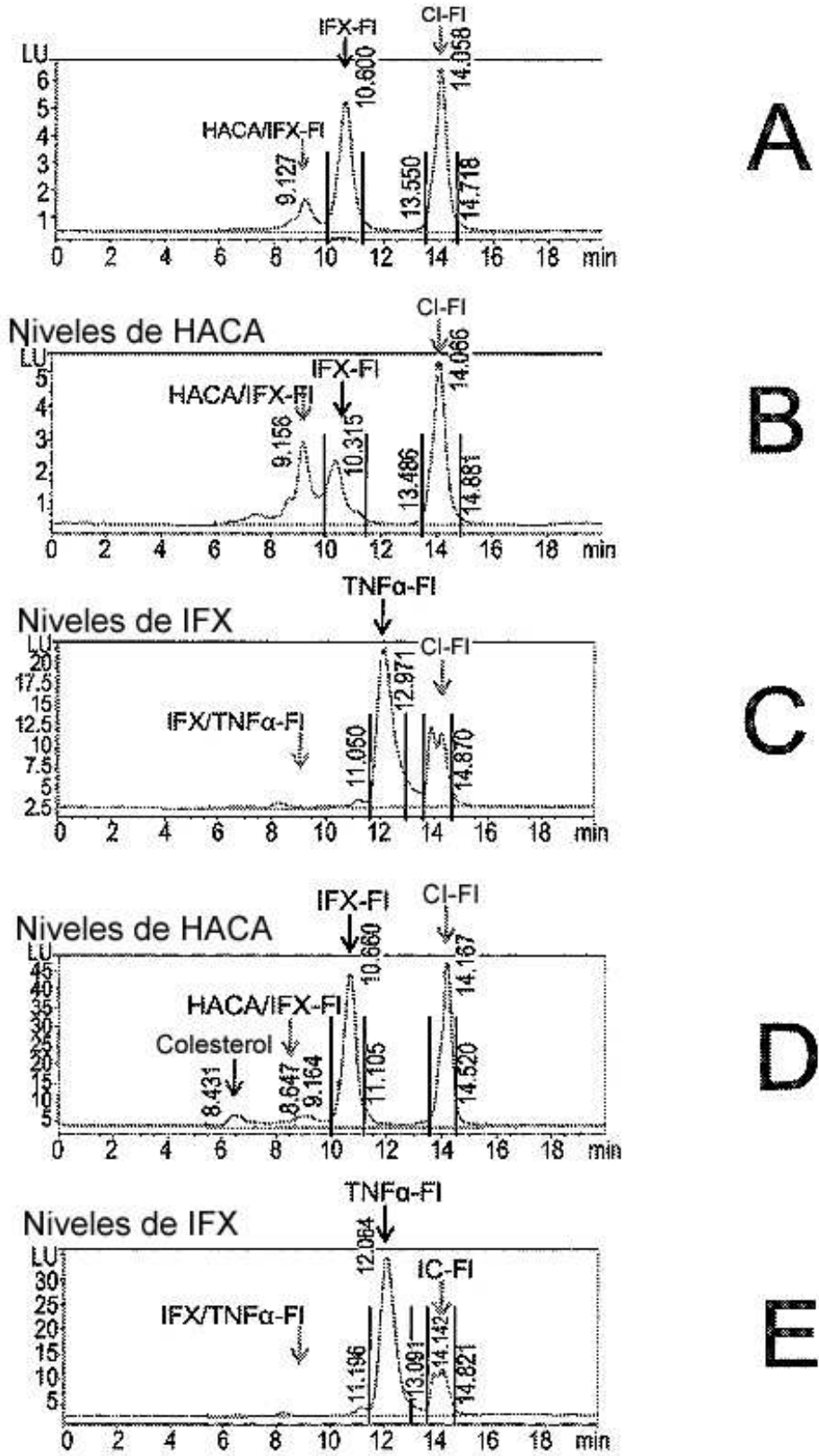


FIG. 33

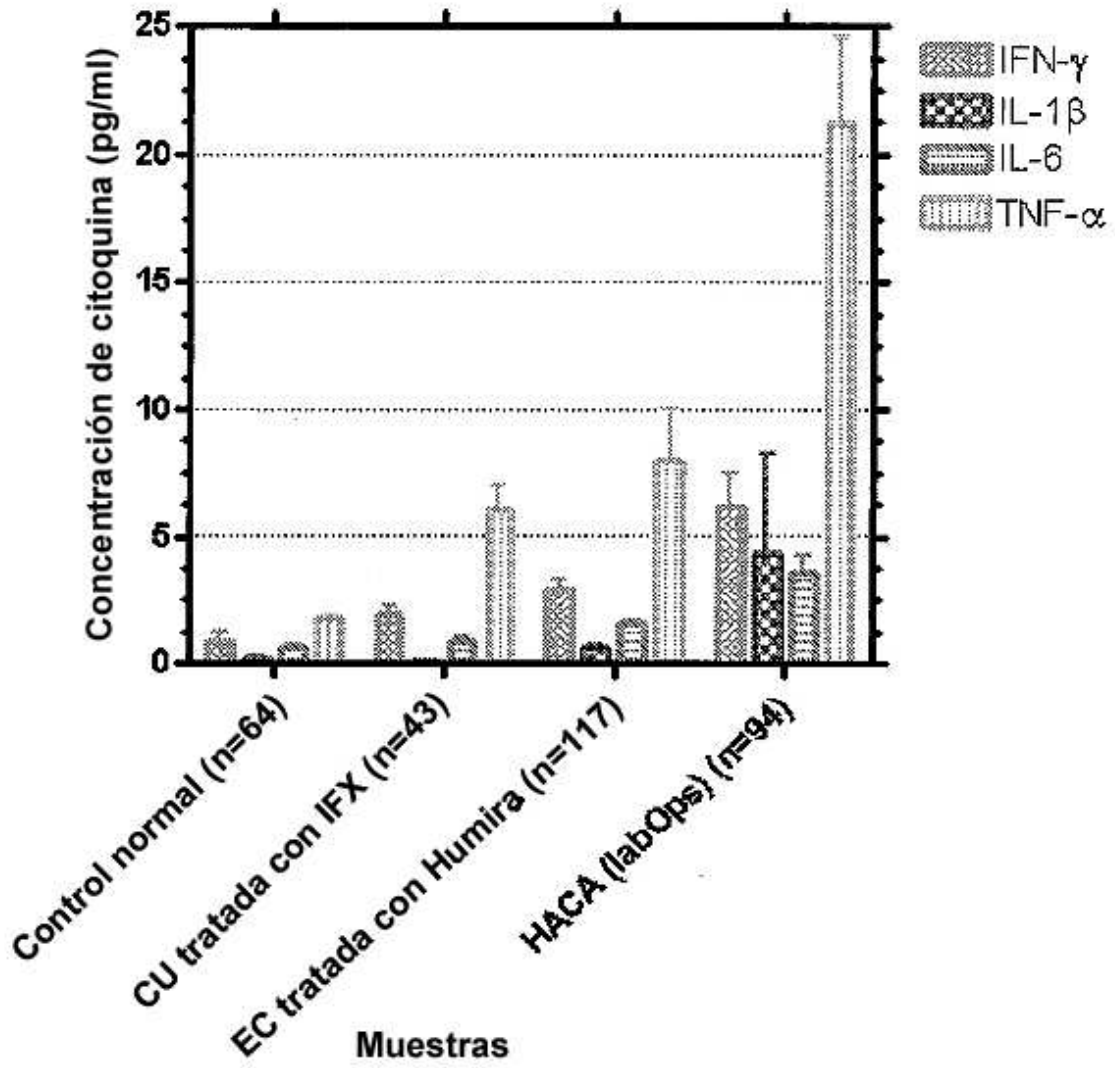


FIG. 34

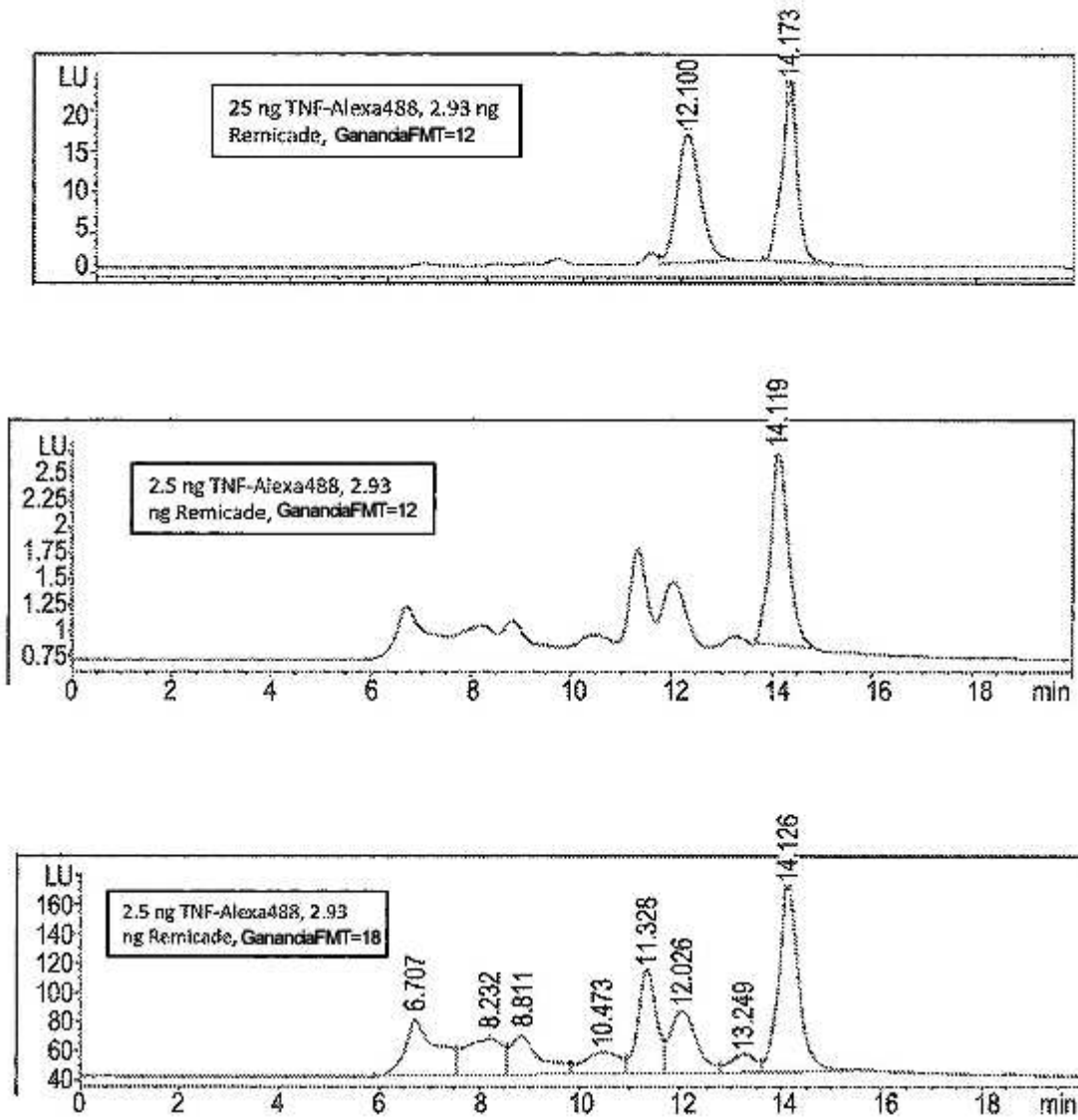


FIG. 35

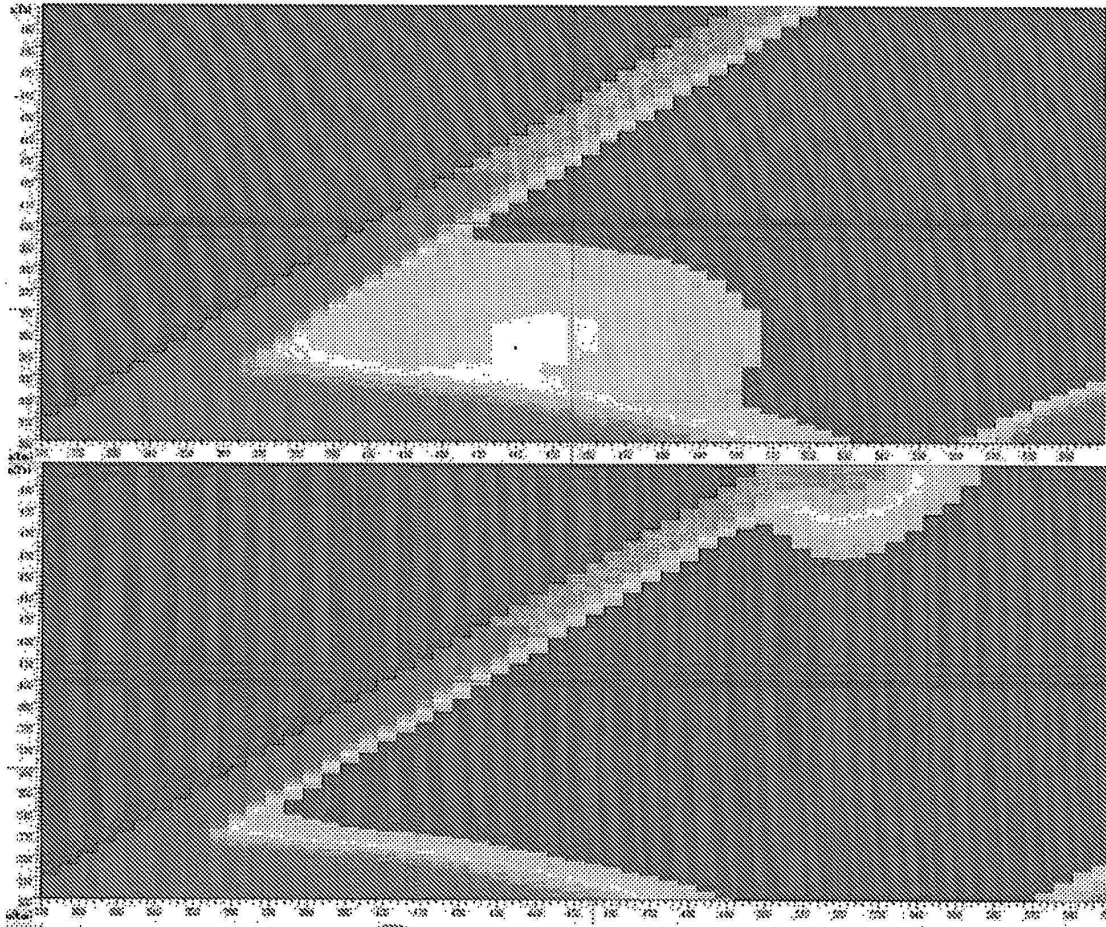


FIG. 36

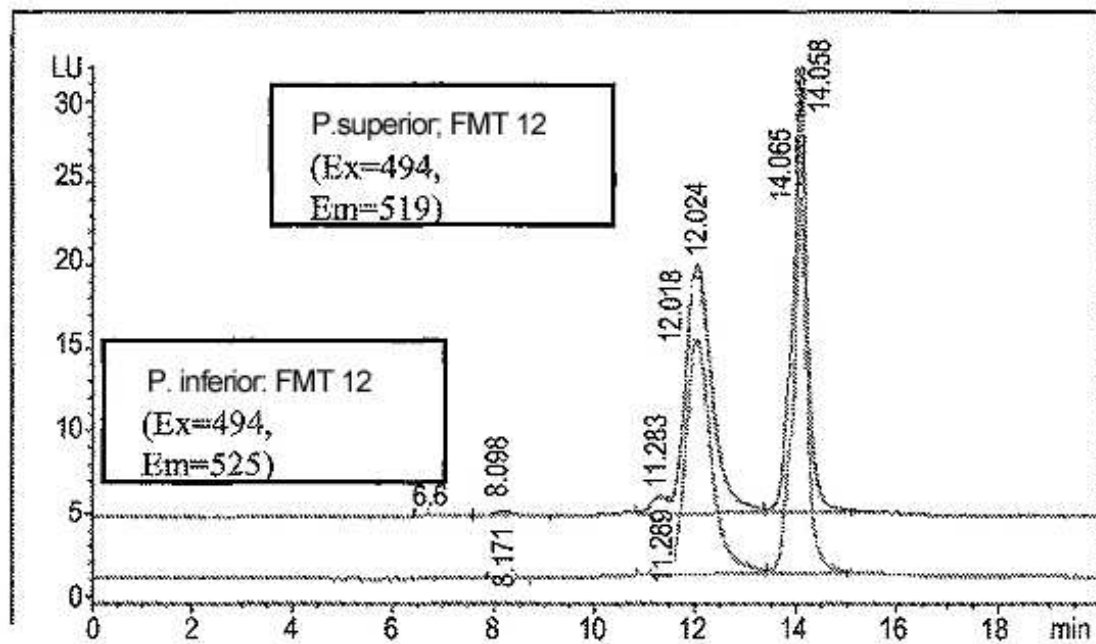
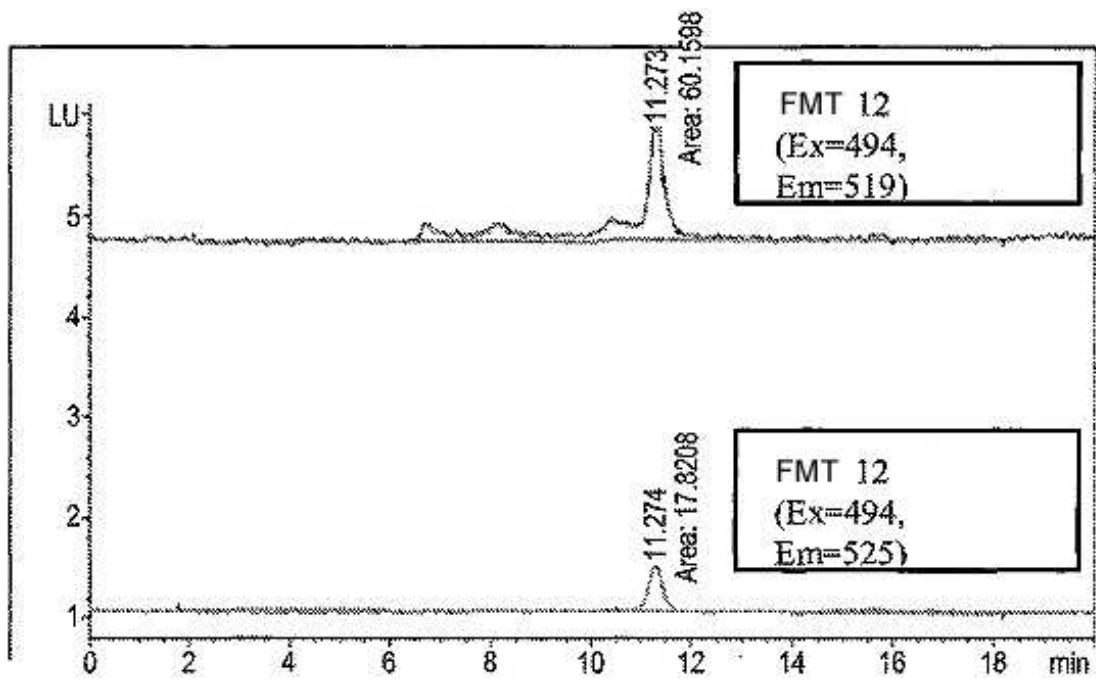


FIG. 37

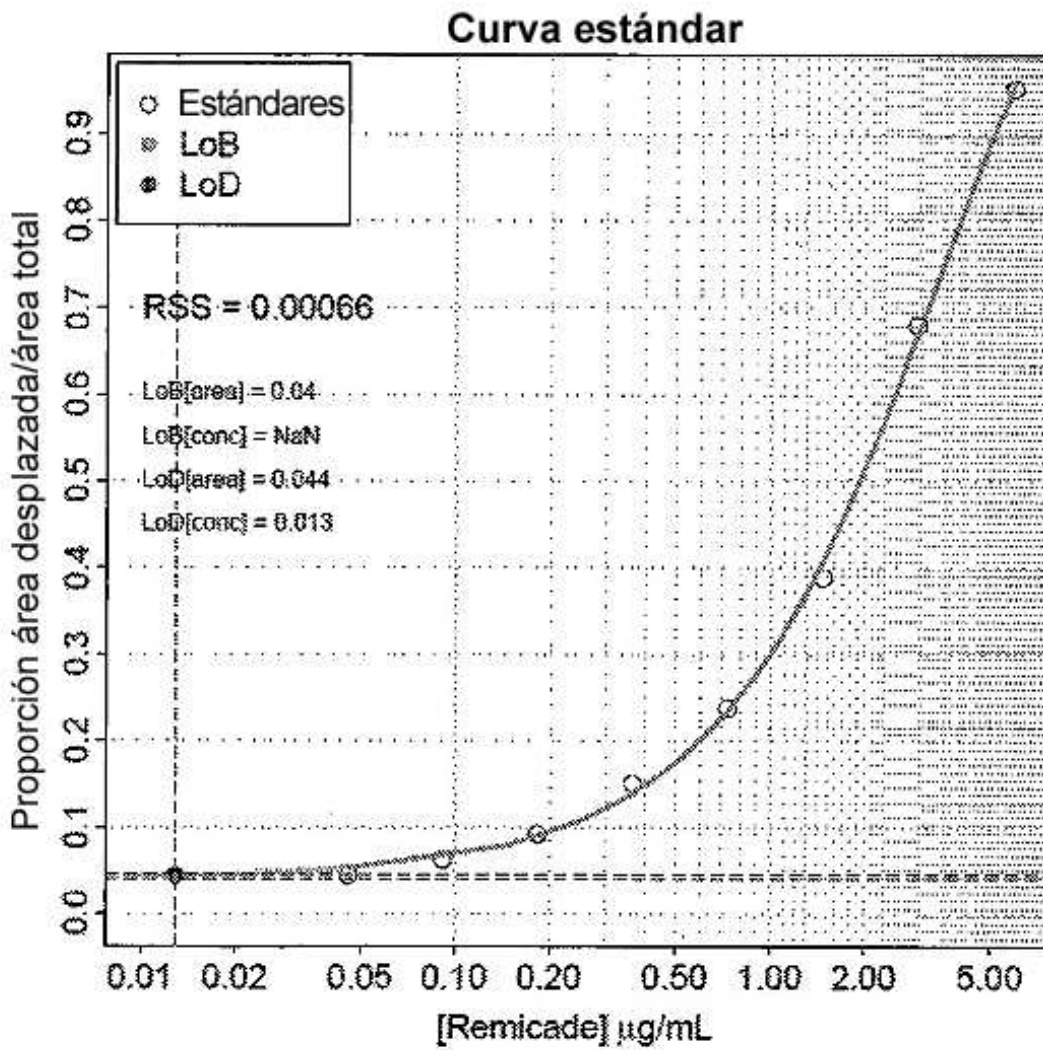


FIG. 38

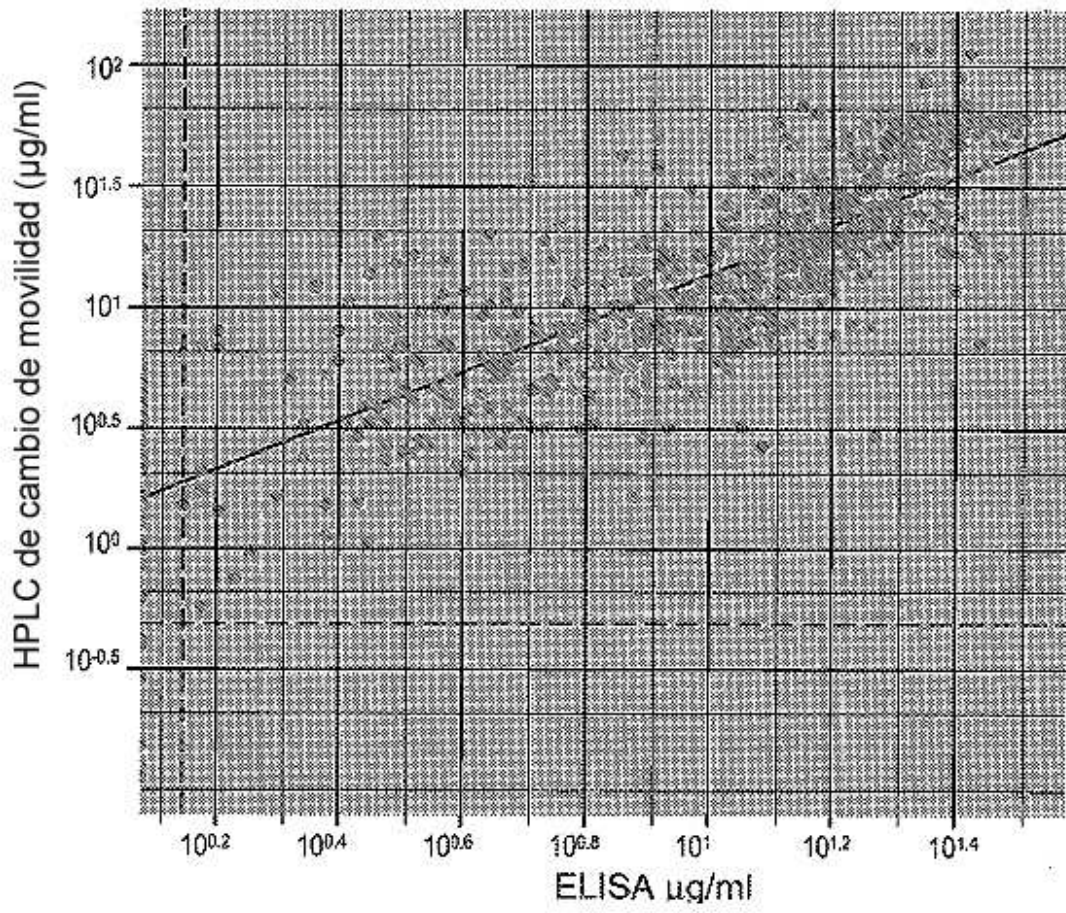


FIG. 39

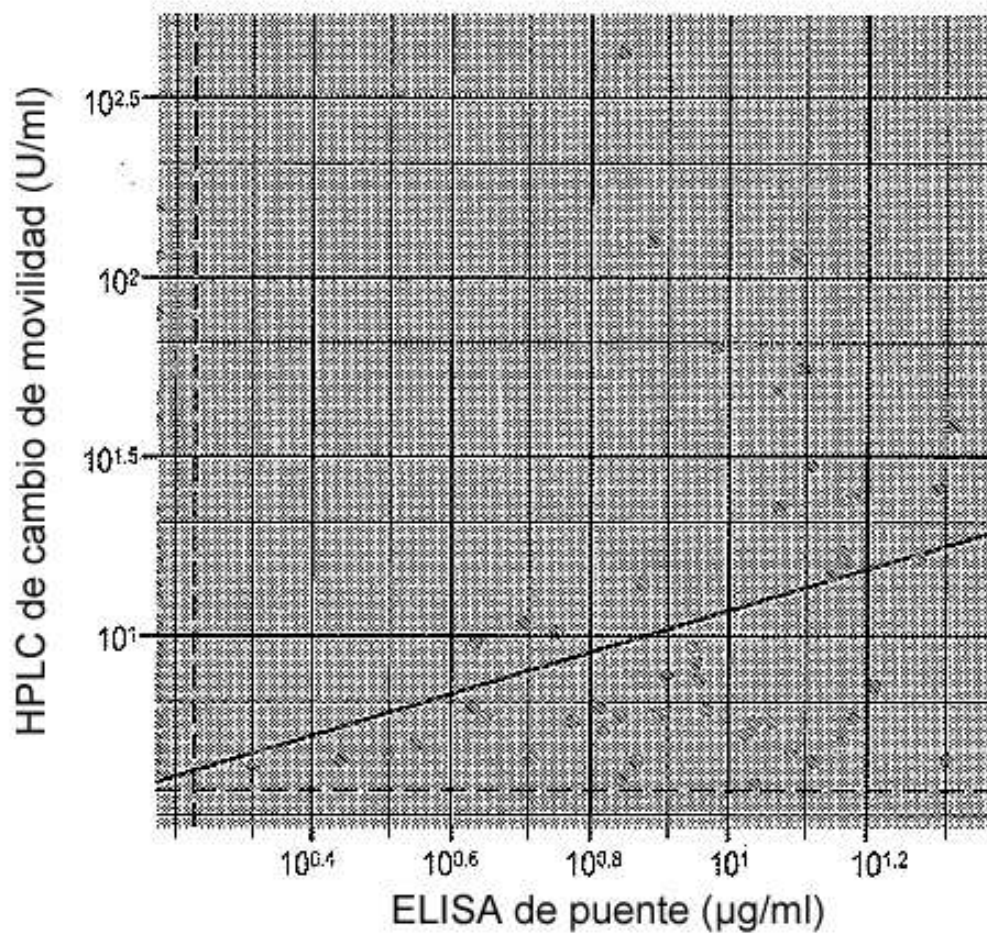


FIG. 40

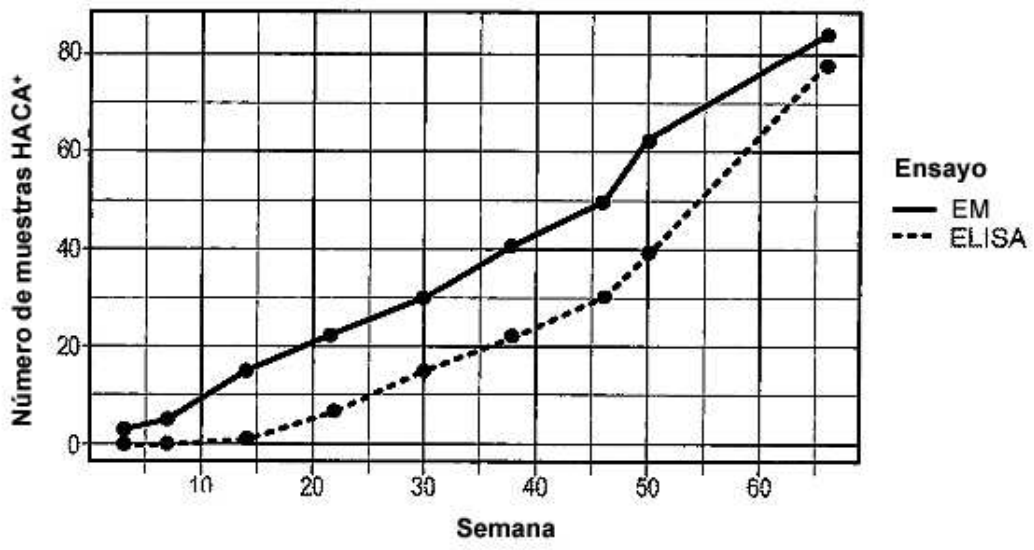


FIG. 41