

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 533**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11716417 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2564202**

54 Título: **Procedimientos para detectar anticuerpos contra un fármaco**

30 Prioridad:

**29.04.2010 US 329201 P**  
**29.04.2010 EP 10305455**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2015**

73 Titular/es:

**THERADIAG SA (100.0%)**  
**14 rue Ambroise Croizat**  
**77183 Croissy-Beaubourg, FR**

72 Inventor/es:

**PARUSSINI, ERMIS y**  
**NOGUIER, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 548 533 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

Procedimientos para detectar anticuerpos contra un fármaco

La presente invención hace referencia a los procedimientos para detectar anticuerpos contra un fármaco. La presente invención también hace referencia a los procedimientos para vigilar los pacientes que están sometidos a un tratamiento con anticuerpos terapéuticos.

### Antecedentes de la invención

Los anticuerpos terapéuticos se están utilizando cada vez más para el tratamiento de diferentes trastornos, tales como trastornos inmunitarios, trastornos inflamatorios, neoplasias malignas o enfermedades infecciosas. Estos anticuerpos terapéuticos son típicamente anticuerpos monoclonales procedentes de diferentes especies, o anticuerpos humanizados o quiméricos (véase, p. ej., Levene et al., 2005, *J. Royal Soc. Med.* 98, pág. 145-152). Según la enfermedad, se han utilizado anticuerpos terapéuticos dirigidos contra los siguientes antígenos deseados de manera independiente: TNF $\alpha$ , VEGF, HER2, CD20, receptor del IGF-I, EGFR o receptor de la IL-6, por ejemplo.

Los anticuerpos terapéuticos anti-TNF $\alpha$  se utilizaron ampliamente para tratar a los pacientes con diferentes enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, entre ellas artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o espondilitis anquilosante. Los ejemplos de tales agentes anti-TNF $\alpha$  incluyen etanercept, golimumab, certolizumab pegol, adalimumab o infliximab. El etanercept es una proteína de fusión dimérica que consiste en dos dominios extracelulares del receptor p75 de TNF $\alpha$  de humano, unido al fragmento Fc de una inmunoglobulina humana de tipo 1 (IgG1). El golimumab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  de humano. El certolizumab pegol es un anticuerpo monoclonal, con más precisión un fragmento Fab' PEGilado de un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  humanizado. El adalimumab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  humanizado y el infliximab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  quimérico (Perdriger A, «Infliximab in the treatment of rheumatoid arthritis». *Biologics: Targets & Therapy* 2009: 3, 183-191). Estos anticuerpos se fijan al TNF $\alpha$  y bloquean su acción inflamatoria.

Otros ejemplos de los anticuerpos terapéuticos incluyen, sin limitación, un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/096274 y un anticuerpo anti-IGF-IR tal y como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 2005/005635.

Sin embargo, durante el tratamiento con anticuerpos terapéuticos se puede generar una respuesta inmunitaria contra el propio anticuerpo terapéutico y los pacientes a menudo desarrollan, durante el transcurso del tratamiento, anticuerpos contra el propio fármaco («anticuerpos contra un fármaco»). Como resultado, la proporción plasmática del anticuerpo terapéutico disminuye y, de manera simultánea o posterior, reaparecen o se incrementan los síntomas de la enfermedad. Así pues, estos anticuerpos contra un fármaco («ACF») reducen o neutralizan totalmente el efecto de un anticuerpo terapéutico (véase, p. ej., Wolbink G. J. et al. «Development of anti-Infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis». *Arthritis & Rheumatism*, 2006, 54 (3): 711-715; G. M. Bartelds et al. «High levels of human antibodies to adalimumab in a patient not responding to adalimumab treatment». *Anna Rheum Dis* 2006; 65: 1249-1250). La detección de estos ACF en las muestras de un sujeto podrían representar, por lo tanto, un procedimiento para vigilar a los pacientes durante el transcurso del tratamiento.

Se han descrito en la técnica procedimientos para detectar los ACF, tales como, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> WO 2008/137885, WO 2007/101661 o WO 2009/091240. Los procedimientos citados en estas solicitudes son procedimientos inmunológicos que utilizan anticuerpos de captura y de marcación. Se han descrito otros procedimientos y recomendaciones relacionados con la detección de los ACF en Anthony R. Mire-Sluis et al., *Journal of Immunological Methods*, 333 (2008) 1-9, Eugen Koren et al., *Journal of Immunological Methods*, 289 (2004) 1-16). Wolbink et al (*Arthritis & Rheumatism* 54 (2006) 711-715) también debaten sobre la importancia clínica de los anticuerpos contra el infliximab en los pacientes con artritis reumatoide. Ninguno de estos procedimientos se propone la evaluación simultánea de los ACF y del antígeno pertinente. Ninguno de estos procedimientos reconoce la importancia de una detección combinada de diferentes parámetros.

Patton et al. (*J. Immunol. Methods*. 304 (2005) 189-195) hacen referencia a un procedimiento de ELISA para detectar anticuerpos contra proteínas.

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para la detección de los ACF y la vigilancia de los pacientes que están sometidos a tratamientos con anticuerpos terapéuticos.

### 50 Compendio de la invención

La presente invención da a conocer procedimientos inmunológicos mejorados para detectar anticuerpos contra un fármaco. La presente invención también da a conocer procedimientos para vigilar a los pacientes que están sometidos a un tratamiento con anticuerpos terapéuticos. Se describen los kits idóneos para la aplicación de los procedimientos anteriores.

Más específicamente, un objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para inmunodetectar (la presencia o la cantidad de) anticuerpos contra un fármaco (ACF) en una muestra (*in vitro*), en donde el fármaco es un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende:

- a) verificar la presencia del antígeno en la muestra;
- 5 b) si está presente, neutralizar el antígeno en la muestra; y
- c) inmunodetectar (la presencia o la cantidad de) dicho ACF en dicha muestra.

Los inventores han descubierto que la presencia del antígeno en la muestra dificulta sustancialmente la capacidad de detección del correspondiente ACF. Por consiguiente, no se puede obtener la detección fiable del ACF en una muestra si no se hace tal etapa de neutralización anterior.

10 Otro objeto descrito en la presente memoria es un procedimiento para inmunodetectar un anticuerpo contra un fármaco (ACF) en una muestra (*in vitro*), en donde el fármaco es un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende:

- a) tratar la muestra para neutralizar el antígeno que puede estar presente; y
- b) inmunodetectar la presencia o la cantidad de dicho ACF en dicha muestra.

15 La invención también se refiere a un procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpos terapéuticos, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de:

- el anticuerpo terapéutico,
- 20 – el antígeno, y
- los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico;

para obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica la capacidad de respuesta a dicho tratamiento, y en donde los ACF se detectan según el procedimiento para inmunodetectar un ACF de la invención.

25 Preferiblemente, en el procedimiento anterior, si el antígeno está presente en la muestra, entonces se realiza otra etapa para determinar la presencia de dicho ACF después del tratamiento de la muestra para neutralizar el antígeno. Por consiguiente, en un aspecto preferido descrito en la presente memoria, el procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpo terapéutico, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra un antígeno deseado, comprende:

(a) determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de:

- 30 – el anticuerpo terapéutico,
- el antígeno, y
- los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico;

(b) si el antígeno se detecta en la muestra de la etapa (a), entonces tratar otra muestra del sujeto para neutralizar el antígeno y determinar de nuevo la presencia de dicho ACF en dicha muestra tratada,

35 por lo que se obtiene un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica la capacidad de respuesta a dicho tratamiento.

Dicho procedimiento se realiza preferiblemente en diferentes momentos de tiempo a lo largo del transcurso del tratamiento del paciente, de tal manera que se puede vigilar la capacidad de respuesta del paciente o la eficacia del tratamiento y, si es apropiado, se puede ajustar el tratamiento.

40 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpos terapéuticos, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra el TNF $\alpha$ , en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de TNF $\alpha$  inactivo, en donde dicha presencia o cantidad es indicativa de la capacidad de respuesta baja o en disminución que presenta el paciente a dicho tratamiento. En una realización preferida, el procedimiento también  
45 comprende determinar la presencia o la cantidad de anticuerpo terapéutico y los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico para obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica

la capacidad de respuesta a dicho tratamiento.

También se describe el dar a conocer un procedimiento para tratar a un paciente, en donde el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado y valorar la capacidad de respuesta del paciente a dicho tratamiento con anticuerpos terapéuticos, tal y como se describe más arriba.

Se describe un kit que comprende reactivos para detectar, en una muestra, la presencia o la cantidad de:

- un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado,
- el antígeno, y
- los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico.

10 El procedimiento se realiza preferiblemente mediante ELISA o inmunocaptura, y el antígeno es preferiblemente el TNF $\alpha$ .

#### **Leyenda de las figuras**

Figura 1: Cuantificación de los ACF. HRP: peroxidasa de rábano picante; SA: estreptavidina; B: biotina.

Figura 2. Influencia del antígeno sobre la determinación del ACF.

15 Figura 3: Cuantificación del TNF $\alpha$ .

Figura 4: Cuantificación del anti-TNF $\alpha$ .

Figura 5: Vigilancia del paciente.

Figura 6: Valores de puntuación representativos de la vigilancia.

#### **Descripción detallada de la invención**

20 La invención se refiere a los procedimientos para detectar ACF y para vigilar a los pacientes que están en tratamiento con anticuerpos terapéuticos. La invención describe la mejora de los procedimientos de detección de ACF que proporcionan datos e información fiables. Los inventores han demostrado que el tratamiento previo de una muestra para neutralizar cualquier antígeno presente en la muestra es esencial para realizar una valoración fiable de los ACF. Los inventores también han demostrado que la determinación simultánea, en una muestra del sujeto, de tres parámetros (ACF, antígeno, fármaco) proporciona un perfil predictivo de la evolución del paciente y de la respuesta al tratamiento. Por lo tanto, la invención da a conocer un procedimiento eficaz para vigilar a los pacientes que están en tratamiento con anticuerpos terapéuticos y permite un ajuste adecuado y eficaz de la pauta del tratamiento.

La invención se conocerá mejor mediante la referencia a las siguientes definiciones:

30 **Definiciones**

La terminología «anticuerpo terapéutico» según la invención hace referencia a cualquier anticuerpo que se puede administrar a un sujeto como un agente activo. Ejemplos concretos de tales anticuerpos terapéuticos son los anticuerpos utilizados para el tratamiento de los trastornos inflamatorios, tales como la artritis reumatoide o la artrosis. Estos incluyen, específicamente, anticuerpos contra el TNF $\alpha$ . La terminología «anticuerpo terapéutico» también incluye derivados del anticuerpo o moléculas de ligando específicas del antígeno, tales como fragmentos Fab de anticuerpo o fragmentos Fc de anticuerpo, receptores sintéticos, receptores solubles y similares, que se fijan selectivamente al antígeno deseado.

La terminología «ACF» o «anticuerpos contra un fármaco» designa un anticuerpo que se fija a un anticuerpo terapéutico en un sujeto. Los ACF se pueden fijar a diferentes epítomos de un anticuerpo terapéutico, lo que incluye las regiones variables o las regiones constantes.

Tal y como se utiliza en la descripción, la terminología «sujeto» o «paciente» designa a cualquier sujeto o paciente mamífero, preferiblemente un sujeto o paciente humano.

Tal y como se utiliza en la descripción, la terminología «determinación combinada» indica que los marcadores especificados se valoran a la vez, o bien secuencialmente, en la muestra. No se necesita la valoración concomitante, aunque se prefiere y es más conveniente.

El término «muestra» indica cualquier muestra que pudiera contener anticuerpos. Este término designa preferiblemente un líquido biológico, tal como suero, plasma o sangre total, o un derivado del mismo (p. ej., como resultado de la dilución, pretratamiento, enriquecimiento, lisis, etc., de un líquido biológico). La muestra es preferiblemente una muestra de plasma, sangre o suero, o una dilución de la misma.

5 Determinación de los ACF

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para determinar los ACF en una muestra. Este aspecto de la invención surge a raíz, entre otros, del descubrimiento de que el antígeno afecta por sí mismo a la determinación cuantitativa de los ACF en la muestra. Tal y como se observa en el apartado experimental, en presencia del antígeno en la muestra analizada, la cantidad medida de ACF está en gran medida sobreestimada, lo que convierte a la prueba en inútil y poco fiable. La invención demuestra que, al neutralizar primero el antígeno en la muestra, se puede obtener una medida fiable. Así pues, la invención se refiere a un procedimiento para inmunodetectar anticuerpos contra un fármaco (ACF) en una muestra (*in vitro*), en donde el fármaco es un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende:

- a) verificar la presencia del antígeno en la muestra;
- 15 b) si está presente, neutralizar el antígeno en la muestra; y
- c) inmunodetectar la presencia o la cantidad de dichos ACF en dicha muestra.

También se describe el dar a conocer un procedimiento para inmunodetectar anticuerpos contra un fármaco (ACF) en una muestra, en donde el fármaco es un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende:

- 20 a) tratar la muestra para neutralizar el antígeno que pueda estar presente; y
- b) inmunodetectar la presencia o la cantidad de dichos ACF en dicha muestra.

La etapa de neutralizar el antígeno se puede realizar mediante técnicas diferentes. Preferiblemente, el antígeno se neutraliza mediante el tratamiento ácido de la muestra (por lo general seguido por la neutralización del ácido), al agotar o capturar el antígeno en la muestra, o mediante inmunoneutralización.

- 25 Para el tratamiento con ácido, la muestra se trata preferiblemente para reducir el pH por debajo de 4, más preferiblemente en un margen comprendido entre aproximadamente 2,5 y 3,5. Esto se puede realizar mediante la adición a la muestra, antes de la reacción, de una solución ácida en las condiciones (p. ej., concentración y fuerza) idóneas para reducir el pH al margen preferido anterior. Los ejemplos de ácidos idóneos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácido acético, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. Preferiblemente, después del tratamiento con ácido, el pH de la muestra se neutraliza, al menos parcialmente, antes de detectar los ACF. Esta neutralización se puede obtener con la adición de una solución básica a la muestra. Así pues, el tratamiento con ácido comprende típicamente:

- añadir a la muestra, antes de la reacción, una solución de ácido para reducir el pH por debajo de aproximadamente 4;
- 35 – incubar la muestra acidificada a temperatura ambiente; y
- añadir a la muestra acidificada, antes de la reacción, una solución básica, tal como un tampón de TRIS o un tampón de fosfato, o un tampón de carbonato, o un tampón de borato, para neutralizar el ácido y restaurar un pH por encima de 4, típicamente entre 5 y 9, más típicamente entre 6 y 8.

- 40 El antígeno también se puede neutralizar mediante la captura o agotamiento con cualquier reactivo de afinidad adecuado. Típicamente, la muestra se pone en contacto con un soporte revestido, o que contiene, un reactivo de fijación específico para el antígeno. Después del pase o de la puesta en contacto, el antígeno queda inmovilizado o retenido por el soporte y la muestra recogida o resultante está sustancialmente desprovista del antígeno libre. La muestra se puede tratar a través de una columna revestida con un anticuerpo específico contra el antígeno. Como alternativa, se pueden añadir perlas revestidas con tal anticuerpo a la muestra y, facultativamente, separarlo o retirarlo del medio con posterioridad.
- 45

La inmunoneutralización se puede realizar con anticuerpos monoclonales o policlonales;

En una realización preferida, el antígeno está neutralizado por el tratamiento con ácido.

La inmunodetección de los ACF se puede realizar mediante diferentes tipos o plataformas de inmunoensayo que incluyen, sin limitación, ELISA, inmunocaptura, micromatrices (chips de proteínas), citometría de flujo (que incluye, p.

ej. Fidis) o multitransferencias puntiformes.

En realizaciones preferidas, los ACF se inmunodetectan por ELISA o inmunocaptura. En tales procedimientos, un reactivo de captura se inmoviliza en un soporte, la muestra analizada se deposita sobre el soporte y la formación de un complejo inmunitario entre el soporte y el ACF de la muestra, si está presente, se mide con un reactivo indicador.

- 5 Típicamente, para determinar los ACF, el reactivo de captura del revestimiento o inmovilizado es el propio fármaco (a saber, el anticuerpo terapéutico). El reactivo indicador puede ser un reactivo contra el ACF o específico del ACF, tal como un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo de conejo o cabra contra la Ig de humano) o el fármaco de nuevo. El reactivo indicador puede estar marcado él mismo o ser detectable a través un agente de revelado (estreptavidina/biotina; peroxidasa; marcación enzimática, marcación luminiscente, etc.).
- 10 En una realización concreta, el reactivo de captura es el propio fármaco y el reactivo indicador es el fármaco biotinilado, que se puede detectar tras la incubación con una estreptavidina marcada (véase la figura 1).

- El reactivo de captura puede estar inmovilizado en el soporte mediante diferentes métodos conocidos por sí mismos en la técnica, tales como, pero sin limitación, adsorción, enlace físico o fijación química. La fijación química se puede llevar a cabo p. ej., a través de grupos amino terminales y/o amino laterales, y/o mediante grupos funcionales
- 15 fenólicos o grupos alcohol de azúcar del reactivo a inmovilizar (p. ej., el fármaco o un anticuerpo).

El soporte puede ser cualquier dispositivo idóneo, tal como una placa (placa de titulación multipocillo), un portaobjetos, una placa de Petri, un tubo, una columna, etc. El soporte también puede estar hecho de perlas.

En otra realización, la reacción se lleva a cabo en solución. En esta realización, los reactivos no se inmovilizan sobre un soporte, sino que se mezclan directamente en la solución.

- 20 Tal y como se ilustra en el apartado experimental, la cantidad de ACF medidos en una muestra tratada conforme a la presente invención es fiable y estable, mientras que sin un tratamiento previo para neutralizar el antígeno, los valores obtenidos son falsos y poco fiables (véase la figura 2).

- La invención es particularmente idónea para valorar la presencia de ACF contra un fármaco anti-TNF en un sujeto. Incluso más específicamente, la invención está particularmente adaptada para la detección de ACF contra los anticuerpos terapéuticos anti-TNF $\alpha$ , entre ellos, sin limitación, infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab y certolizumab pegol.
- 25

#### Vigilancia del paciente

- Los anticuerpos contra un fármaco («ACF») disminuyen, reducen o neutralizan el efecto de un anticuerpo terapéutico. Por consiguiente, la detección de estos ACF en las muestras de un sujeto representa un procedimiento
- 30 para vigilar a los pacientes durante el transcurso del tratamiento, así como un procedimiento para mejorar el tratamiento. Cuando se incrementa el título de los ACF, se puede esperar que se reducirá o neutralizará el efecto terapéutico del fármaco. Entonces, en tales situaciones, se recomienda cambiar el protocolo del tratamiento, p. ej., al uso de un fármaco diferente.

- Así pues, en un aspecto concreto, la invención se refiere a un procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpo terapéutico, en donde el procedimiento comprende
- 35 determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico mediante un procedimiento como el descrito más arriba; la presencia de ACF, o un incremento de los mismos, en la muestra es una indicación de una pérdida de capacidad de respuesta del sujeto.

- Se describe el dar a conocer un procedimiento para vigilar a un paciente que está sometido a un tratamiento con anticuerpo terapéutico, en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia
- 40 o la cantidad de anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico mediante un procedimiento como el descrito más arriba; la presencia de ACF, o un incremento de los mismos, en la muestra cuando se compara con un valor de referencia o con un valor determinado en una etapa más temprana del tratamiento, es indicativo de una pérdida de la capacidad de respuesta del sujeto al tratamiento.

- 45 Para vigilar al sujeto o valorar la capacidad de respuesta del sujeto, es incluso más preferible de acuerdo con la presente invención medir no solo los ACF, sino también el fármaco y el antígeno en la muestra. De hecho, la presente invención muestra que tal determinación combinada proporciona una indicación predictiva del estado del sujeto.

- Por consiguiente, la invención también se refiere a un procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un
- 50 paciente a un tratamiento con un anticuerpo terapéutico, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de:

- el anticuerpo terapéutico,
- el antígeno, y
- los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico;

5 para obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica la capacidad de respuesta a dicho tratamiento.

Preferiblemente, tal y como se menciona en la presente invención, la determinación de los ACF se debe realizar después del tratamiento de la muestra para neutralizar el antígeno. Por consiguiente, en el procedimiento anterior, si el antígeno se detecta en la muestra, entonces se realiza una etapa más para determinar la presencia de dicho ACF después del tratamiento de la muestra para neutralizar el antígeno.

- 10 Cuando el nivel de los ACF y/o el nivel del antígeno se incrementa por encima de un valor de referencia o en comparación con un valor determinado en el sujeto en una etapa más temprana del tratamiento; y cuando la cantidad de anticuerpo terapéutico disminuye en función de un valor de referencia o en comparación con un valor determinado en el sujeto en una etapa más temprana del tratamiento, se puede inferir que el paciente ya no responde bien al tratamiento y que se debe adaptar el tratamiento. También se puede utilizar una puntuación de  
 15 vigilancia como se describe a continuación, para inferir directamente, a partir de las medidas, si el tratamiento todavía es idóneo para el paciente.

El procedimiento se realiza preferiblemente en diferentes momentos del tiempo durante el transcurso del tratamiento del paciente, por lo que la capacidad de respuesta del paciente o la eficacia del tratamiento se pueden vigilar y, si resulta adecuado, el tratamiento se puede ajustar. En una realización concreta, la detección se puede realizar antes  
 20 de cada administración del anticuerpo terapéutico. Como alternativa, la detección se puede realizar tres veces en un intervalo de un mes. Para los sujetos que han recibido el tratamiento con el anticuerpo terapéutico durante un periodo de tiempo largo (p. ej., 9 meses o más), una única detección de acuerdo con la invención será suficiente para calificar al paciente como paciente que responde o paciente que no responde.

La figura 5 muestra que el perfil indica la capacidad de respuesta del paciente, y dónde se debe considerar el  
 25 tratamiento como ineficaz y cambiarlo. Como se puede determinar a partir de la figura 5, se pueden distinguir tres situaciones principales:

T0: el sujeto está enfermo y no se trata.

T1-T2: el sujeto se trata y responde al tratamiento. Las muestras analizadas por los inventores muestran que la mayoría de los pacientes tratados encajan en esta categoría.

- 30 Desde T3: el sujeto está en tratamiento, pero no responde. El anticuerpo terapéutico está neutralizado por los ACF. El tratamiento no es eficaz y se debería cambiar.

El anticuerpo terapéutico, el antígeno y el ACF se pueden medir mediante procedimientos de inmunodetección diferentes, tales como ELISA, inmunocaptura, micromatrices (chips de proteínas), citometría de flujo (que incluye, p.  
 35 ej., Fidis) o multitransferencia puntiforme, tal y como se describe más arriba para la determinación de los ACF.

- Típicamente, los tres marcadores se analizan simultáneamente (p. ej., en el mismo dispositivo). Sin embargo, la determinación se puede realizar por separado o secuencialmente.

La invención es particularmente idónea para vigilar a los pacientes que están en tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . Tales  
 40 pacientes padecen típicamente una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, etc. La vigilancia permite la evaluación regular de la eficacia del tratamiento y permite al médico determinar si el tratamiento se podría continuar o se debería adaptar.

En este sentido, la evaluación se hace preferiblemente con la valoración de la cantidad de TNF $\alpha$ , ACF y anticuerpo  
 45 terapéutico anti-TNF $\alpha$  en un sujeto. Los valores obtenidos pueden ser cualitativos o cuantitativos. Se pueden comparar con valores de referencia o con la cantidad registrada para el mismo paciente en una etapa más temprana del tratamiento. En una realización concreta, los valores se calculan con una «tabla de puntuaciones» que permite vigilar directamente al paciente.

En una primera etapa se analiza una muestra de un paciente, tal y como se describe más arriba, para cuantificar la  
 50 cantidad de los 3 marcadores: TNF $\alpha$ , anti-TNF $\alpha$  y ACF. En una segunda etapa, con el uso de una «tabla de puntuaciones», la fracción de cada parámetro está asociada a una puntuación. A continuación se obtiene una puntuación global de la vigilancia, que consiste en la suma de la puntuación de cada parámetro: Puntuación de  
 vigilancia = puntuación del TNF + puntuación del anti-TNF + puntuación del ACF.

A continuación, la puntuación de la vigilancia se puede comparar (o leer) con una escala de vigilancia, que proporciona el estado del sujeto. En este sentido, los inventores han establecido escalas de vigilancia idóneas para calcular los valores de los marcadores adecuados. Estas escalas se dan a conocer a continuación, en relación con el tratamiento con anti-TNF. Otra escala de puntuación se describe en los ejemplos:

5 Tabla de puntuaciones para cada parámetro

Cantidad de TNF (pg/ml)	<10	10 a 100	>100
Puntuación del TNF	0	2	5
Cantidad de anti-TNF (µg/ml)	<0,5	0,5 a 3	>3
Puntuación del anti-TNF	5	3	0
Cantidad de ACF (ng/ml)	<10	10 a 100	>100
Puntuación del ACF	0	10	22

Escala de vigilancia:

Puntuación de la vigilancia	Acción/consejo
0 a 5	Continuar el tratamiento y vigilar la concentración del fármaco
6 a 10	Incrementar el anti-TNF
11 a 40	Considerar el cambio a otro tratamiento

10 Como ejemplo, se analiza de acuerdo con la invención una muestra de suero de un paciente con artritis reumatoide, tratado con infliximab. La cantidad de TNF $\alpha$ , anti-TNF $\alpha$  y ACF es 50 pg/ml, <0,1 µg/ml y 6.600 ng/ml, respectivamente.

La cantidad de TNF $\alpha$  está asociada a un puntuación de 2. La cantidad de anti-TNF está asociada a una puntuación de 5. La cantidad de ACF está asociada a una puntuación de 22.

Así pues, la puntuación de la vigilancia es 29 y la recomendación para el paciente es cambiar a otro tratamiento.

15 El apartado experimental describen los resultados de la prueba realizada por los inventores en más de 300 muestras de suero de humano de pacientes que están en tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . Demuestran que, siguiendo el procedimiento anterior, el estado de los pacientes se puede determinar de manera fiable y se puede detectar y anticipar su progresión hacia un estado de paciente que no responde. Así pues, la presente invención da a conocer, por primera vez, un procedimiento fiable para vigilar a los pacientes y ajustar su tratamiento.

20 Otros marcadores de respuesta

En otra realización preferida, los procedimientos de la invención comprenden la combinación de los valores o puntuaciones anteriores con otros datos del paciente, que se pueden medir o reunir (p. ej., del expediente clínico) para refinar más la prueba. Así pues, en una realización concreta, el procedimiento de la presente invención comprende además determinar la presencia o la cantidad de uno o varios antígenos adicionales, que se pueden

25 seleccionar de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, factores reumatoides y anticuerpos concretos. Los ejemplos preferidos y específicos de tales factores adicionales incluyen:

- Citocina y quimiocinas: IL1, IL6, IL8, IL10, ILK12, IL17, IL23, GM-CSF, IFN $\gamma$ , ProMPP1 y/o ProMPP3;
- Anticuerpos autoinmunitarios: anticuerpos antinucleares (anticuerpos ANA contra el ADN bicatenario (dsDNA)).

30 - Parámetros biológicos y parámetros hemáticos: proteína C reactiva (PCR), factor reumatoideo RF, amiloide A sérica, IgG, IgA, IgM, hemoglobina, velocidad de sedimentación globular (VSG), número de glóbulos blancos y plaquetas, número de linfocitos B CD19-, número de linfocitos T CD3, CD4, CD8, CD4-CD25 y/o CD8-HLA-DR.

- Parámetros del paciente: tales como sexo, constantes vitales, edad o DAS28, peso
- Parámetros del tratamiento: posología.

Las concentraciones de los biomarcadores (TNF, anti-TNF y ACF) se miden con un inmunoensayo cuantitativo y se combinan con los otros parámetros de los datos clínicos establecidos para generar la puntuación de la vigilancia. El algoritmo utiliza diferentes ponderaciones ( $W_n$ ) para valorar la eficacia del tratamiento (puntuación de la vigilancia). La puntuación resultante de la vigilancia se escala de tal manera que cada resultado de la prueba es un número decimal entre 1 y 10. A modo de ejemplo, el algoritmo de la puntuación de la vigilancia es el siguiente:

$$\text{Puntuación de la vigilancia} = W1 \times \{\text{TNF}\} + W2 \times \{\text{anti-TNF}\} + W3 \times \{\text{ACF}\} + W4 \times \{\text{PCR}\} + W5 \times \{\text{VSG}\}.$$

$W_n$ : es la ponderación para cada parámetro, de acuerdo con la importancia de estos parámetros sobre el impacto del tratamiento.

{TNF}: factor de puntuación del TNF. El impacto del TNF sobre la puntuación de la vigilancia de acuerdo con la concentración medida del TNF.

{anti-TNF}: factor de puntuación del anti-TNF. Impacto del anti-TNF sobre la puntuación de la vigilancia, de acuerdo con la concentración medida del anti-TNF. El factor de puntuación del anti-TNF es dependiente de la «posología» (información disponible en el conjunto de datos clínicos).

{ACF}: factor de puntuación de los ACF. Impacto de los ACF sobre la puntuación de la vigilancia, de acuerdo con la concentración medida de los ACF.

{PCR}: factor de puntuación de la PCR. Impacto de la PCR sobre la puntuación de la vigilancia, de acuerdo con la concentración de la proteína C reactiva proporcionada por el conjunto de datos clínicos.

{VSG}: factor de puntuación de la VSG. Impacto de la VSG sobre la puntuación de la vigilancia, de acuerdo con la velocidad de sedimentación globular, proporcionada por el conjunto de datos clínicos. La velocidad de sedimentación es dependiente «de la edad y del sexo»; información en el conjunto de datos clínicos.

La puntuación de la vigilancia se diseñó para ser utilizada junto con los datos clínicos completos establecidos para ayudar al médico en su decisión sobre el transcurso del tratamiento. La puntuación de la vigilancia es un número escalado entre 1 y 10. De acuerdo con la puntuación de la vigilancia, la interpretación de la eficacia del tratamiento se puede realizar, p. ej., como se muestra en la figura 6.

TNF $\alpha$  inactivo como marcador del cambio de tratamiento

Hemos determinado la actividad biológica del TNF $\alpha$  detectada en los pacientes que no responden al tratamiento (véase el área T3 y T4 de la figura 5). La actividad se detectó mediante la evaluación de la lisis de las células deseadas tras la exposición a las muestras de TNF $\alpha$ . Nuestros resultados demuestran sorprendentemente que este TNF $\alpha$  es biológicamente inactivo. Estos resultados eran totalmente inesperados y nunca se había descrito que los pacientes que están en tratamiento con anti-TNF $\alpha$  tuvieran el TNF $\alpha$  inactivo en circulación. Nuestros resultados muestran además que la concentración de TNF $\alpha$  inactivo está correlacionada con la ausencia de respuesta de los pacientes a su tratamiento con anti-TNF. La presencia de tal TNF $\alpha$  inactivo resulta intrigante. Planteamos la hipótesis de que el TNF $\alpha$  es capturado primero por los anticuerpos terapéuticos anti-TNF $\alpha$  y posteriormente se libera cuando el ACF se fija a las moléculas del anticuerpo terapéutico. El TNF $\alpha$  liberado con el ACF estaría inactivo (o inactivado) como resultado de la alteración o alteraciones conformacionales o estructurales ocasionadas por la fijación del ACF.

Por lo tanto, la dosificación del TNF $\alpha$  inactivo en los pacientes que están en tratamiento con anti-TNF representa un medio nuevo y muy fiable para determinar la capacidad de respuesta del paciente y para ajustar el tratamiento (p. ej., cambio de tratamiento a otro anticuerpo terapéutico u otra clase de tratamiento).

Por lo tanto, en una realización concreta, la invención se refiere a un procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpo terapéutico, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra el TNF $\alpha$ , en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de TNF $\alpha$  inactivo, en donde dicha presencia o cantidad es indicativa de la capacidad de respuesta baja o en disminución del paciente a dicho tratamiento.

También se describe el dar a conocer un procedimiento para vigilar a un paciente que está en tratamiento con anti-TNF $\alpha$ , en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de TNF $\alpha$  inactivo, en donde dicha presencia o cantidad es indicativa de la capacidad de respuesta del paciente a dicho tratamiento. La aparición del TNF $\alpha$  inactivo es una indicación de que el sujeto comienza a escapar del tratamiento. El incremento de la cantidad de tal TNF $\alpha$  inactivo indica que hay que cambiar al paciente a otro tratamiento.

«TNF $\alpha$  inactivo» designa, en este contexto, un TNF $\alpha$  que no ocasiona la lisis de las células destinatarias *in vitro*. El TNF $\alpha$  inactivo más específicamente incluye el TNF $\alpha$  inactivado, p. ej., TNF $\alpha$  inactivado por anticuerpos. En las realizaciones anteriores, el procedimiento puede además comprender una etapa de detección de la actividad biológica del TNF $\alpha$  en la muestra analizada. Como alternativa, o además, el procedimiento puede comprender una

- 5 etapa de detección de la estructura de una molécula de TNF $\alpha$  inactivo.
- En una realización preferida, el procedimiento anterior también comprende una determinación de la presencia o de la cantidad de anticuerpo terapéutico anti-TNF $\alpha$  y los anticuerpos contra un fármaco para obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica la capacidad de respuesta a dicho tratamiento. En otra realización preferida, el procedimiento además comprende la detección de otros parámetros tal y como se especifica más arriba.
- 10 También se describe un kit que comprende:
- uno o varios reactivos para detectar, en una muestra, la presencia o la cantidad de anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra un anticuerpo terapéutico;
  - uno o varios reactivos para neutralizar el antígeno destinatario de dicho anticuerpo terapéutico en la muestra.

15 Se describe un kit o procedimiento de inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa combinada del TNF $\alpha$  humano, un fármaco anti-TNF $\alpha$  (preferiblemente infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab o certolizumab pegol) y los correspondientes ACF en las muestras de suero de humano. Este kit permite al médico vigilar la evolución del valor de estos 3 parámetros en los sueros de pacientes.

Se describirán más aspectos y ventajas en el siguiente apartado experimental, que se debe considerar sólo a modo

20 ilustrativo.

### Ejemplos

En el apartado experimental, cada dosis es cuantitativa, está calibrada con respecto a los estándares. La dosificación del TNF (pg/ml) se realiza con la ayuda del estándar internacional. La dosificación del fármaco ( $\mu$ g/ml) se realiza gracias al valor de la concentración dado por la compañía farmacéutica. La dosificación del ACF (ng/ml)

25 se realiza con un anticuerpo policlonal de conejo como estándar. Los conejos (de origen Hyla) se inmunizan con fragmentos Fab o Fab'<sub>2</sub> de las inmunoglobulinas anti-TNF o con el receptor P75 del TNF de humano. La cuantificación del estándar humano del ACF se obtiene mediante el procedimiento de Biuret (dosis de proteína mediante la colorimetría).

Ejemplo A: Procedimiento para detectar los ACF

- 30 Con el fármaco se reviste una placa de microtitulación de poliestireno.
- Primero se añade a la muestra una solución ácida, tal como una solución de ácido acético. La muestra acidificada se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.
  - A continuación, una solución básica, tal como una solución de TRIS, se añade a la muestra acidificada para neutralizar la solución de ácido.
- 35
- A continuación se añade la muestra (diluida o no) al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añade el fármaco biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- 40
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el fármaco biotinilado. Después de la incubación, se lavan los pocillos de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el etanercept.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- 45
- Después de detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra un fármaco de cada una de las muestras

de pacientes expresadas en ng/ml.

El principio de la prueba se describe en la figura 1. Los resultados se muestran en la figura 2.

- Los resultados demuestran sorprendentemente que, cuando el antígeno está presente en la muestra, la cuantificación de los ACF se sobreestima considerablemente. En cambio, después de la neutralización del antígeno mediante tratamiento con ácido, la cuantificación de los ACF es correcta y fiable. La presencia del antígeno durante la dosificación de los ACF implica una dosis errónea de ACF, que podría dar lugar a unos resultados erróneamente positivos. En consecuencia, durante una dosificación positiva del antígeno, es necesario proceder con una segunda prueba de ACF después de la neutralización para obtener un resultado correcto de ACF.

Ejemplo B: Procedimiento y kit para vigilar a los pacientes tratados con etanercept

- 10 La prueba debería realizarse con suero o con plasma. Como el TNF $\alpha$  es inestable en solución, se prefiere que las muestras se utilicen inmediatamente después de la toma de sangre. Si la determinación no se realiza inmediatamente, se deben congelar las muestras. Para evitar cualquier fijación inespecífica, habrá que centrifugar y filtrar las muestras que se habían congelado hacia más de 6 meses o que no son transparentes.

#### 1. Dosificación del TNF $\alpha$

- 15 Con un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).
- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añade el anticuerpo biotinilado anti-TNF $\alpha$ . Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- 20
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de TNF $\alpha$ .
- 25
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
  - Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de TNF $\alpha$  de cada una de las muestras de pacientes expresada en pg/ml.

#### 30 2. Dosificación del etanercept

Con el TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 35
- Se añade el anticuerpo biotinilado anti-IgG de humano. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
  - A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-IgG biotinilados. Después de la incubación, se lavan los pocillos para de nuevo eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 40
- La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de etanercept.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
  - Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de etanercept de cada una de las muestras de pacientes expresada en  $\mu$ g/ml.

3. Dosificación del anti-etanercept

Con el etanercept se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 5 • Se añade el etanercept biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el etanercept biotinilado. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 10 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el etanercept.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro 450 nm.
- 15 Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el etanercept de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

4. Resultados

20 Durante el transcurso del tratamiento, la evolución del valor de los 3 parámetros (TNF, etanercept, anti-etanercept) se ha vigilado de acuerdo con la presente invención en un sujeto humano. Muestras de suero de un paciente con artritis reumatoide (paciente 1) se analizaron antes de la primera infusión del etanercept. Los resultados se describen a continuación:

	TNF (pg/ml)	Etanercept (µg/ml)	Anti-etanercept
Paciente 1, W0	<10	<0,2	<5
Paciente 1, W8	117	1,7	<5

Estos resultados demuestran que la cantidad de TNF y la cantidad de etanercept se incrementan durante el transcurso del tratamiento.

25 Ejemplo C: Procedimiento y kit para vigilar a los pacientes tratados con adalimumab

La prueba se realizó con suero o con plasma. Como el TNFα es inestable en solución, se utilizaron muestras inmediatamente después de la toma de sangre o congeladas. Para evitar cualquier fijación inespecífica, se centrifugaron y se filtraron las muestras que se habían congelado hacia más de 6 meses o que no eran transparentes.

30 1. Dosificación del TNFα

Con un anticuerpo monoclonal anti-TNFα se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 35 • Se añaden los anticuerpos biotinilados anti-TNFα. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-TNFα biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 40 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de TNFα.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.

- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de TNF $\alpha$  de cada una de las muestras de pacientes expresada en pg/ml.

## 5 2. Dosificación del adalimumab

Con el TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 10 • Se añaden los anticuerpos biotinilados contra la IgG de humano. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-IgG biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 15 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de adalimumab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

20 Un margen de calibración permite definir la cantidad de adalimumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en  $\mu$ g/ml.

## 3. Dosificación del anti-adalimumab

Con el adalimumab se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 25 • Se añade el adalimumab biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el adalimumab biotinilado. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 30 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el adalimumab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

35 Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el adalimumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

## 4. Resultados

Durante el transcurso del tratamiento, la evolución del valor de los 3 parámetros (TNF, adalimumab, anti-adalimumab) se ha vigilado utilizando la invención.

40 Las muestras de suero de un paciente con artritis reumatoide (paciente 2) se analizaron antes de la primera infusión de adalimumab (W0) y antes de las posteriores infusiones de adalimumab (W6, W21, W30, W39).

	TNF (pg/ml)	Adalimumab ( $\mu\text{g/ml}$ )	Anti-adalimumab (ng/ml)
Paciente 2, W0	<10	<0,1	<10
Paciente 2, W6	<10	6,4	<10
Paciente 2, W21	<10	16,8	<10
Paciente 2, W30	<10	16,7	<10
Paciente 2, W39	<10	17,1	<10

La tabla anterior muestra que la cantidad de adalimumab se incrementó en dicho paciente durante el transcurso del tratamiento hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 17  $\mu\text{g/ml}$ . La cantidad de TNF y la cantidad de anti-adalimumab no se incrementaron.

#### 5 Ejemplo D: Procedimiento y kit para vigilar a los pacientes tratados con el infliximab

La prueba se realizó con suero o con plasma. Como el TNF $\alpha$  es inestable en solución, las muestras se utilizaron inmediatamente después de la toma de la sangre o congeladas. Para evitar cualquier fijación inespecífica, se centrifugaron y filtraron las muestras que se habían congelado hacía más de 6 meses o que no eran transparentes.

##### 1. Dosificación del TNF $\alpha$

- 10 Con un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).
- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añaden los anticuerpos biotinilados anti-TNF $\alpha$ . Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- 15
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos biotinilados anti-TNF $\alpha$ . Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de TNF $\alpha$ .
- 20
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
  - Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de TNF $\alpha$  de cada una de las muestras de pacientes expresada en pg/ml.

##### 25 2. Dosificación del infliximab

Con el TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 30
- Se añaden los anticuerpos biotinilados contra la IgG de humano. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
  - A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-IgG biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 35
- La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de infliximab.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.

- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de infliximab de cada una de las muestras de pacientes expresada en µg/ml.

### 5 3. Dosificación del anti-infliximab

Con el infliximab se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 10 • Se añade el infliximab biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el infliximab biotinilado. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 15 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el infliximab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

20 Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el infliximab de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

### 4. Resultados

Durante el transcurso del tratamiento, la evolución del valor de los 3 parámetros (TNF, infliximab, anti-infliximab) se ha vigilado en los sujetos humanos.

25 En un primer paciente con artritis reumatoide (paciente 3), las muestras de suero se analizaron antes de la segunda infusión de infliximab (W2) y antes de las posteriores infusiones de infliximab (W6, W14, W28, W42, W56).

	TNF (pg/ml)	Infliximab (µg/ml)	Anti-infliximab (ng/ml)
Paciente 3, W2	<10	<0,1	<10
Paciente 3, W6	<10	<0,1	266
Paciente 3, W14	<10	<0,1	172
Paciente 3, W28	<10	<0,1	192
Paciente 3, W42	<10	<0,1	491
Paciente 3, W56	<10	<0,1	253

Los resultados demuestran que la cantidad de anti-infliximab se incrementó durante el transcurso del tratamiento hasta alcanzar una concentración elevada (>100 ng/ml). La cantidad de TNF y la cantidad de anti-infliximab eran indetectables.

30 En otro paciente con artritis reumatoide (paciente 4), las muestras de suero se analizaron antes de la segunda infusión de infliximab (W2) y antes de la tercera infusión de infliximab (W5).

	TNF (pg/ml)	Infliximab (µg/ml)	Anti-infliximab (ng/ml)
Paciente 4, W2	<10	20,1	<10
Paciente 4, W5	50	<0,1	6.600

Los resultados demuestran que la cantidad de anti-infliximab se incrementó durante el transcurso del tratamiento

hasta alcanzar una concentración elevada (>100 ng/ml). La cantidad de TNF se incrementa a 50 pg/ml y la cantidad de infliximab cae por debajo de 0,1 µg/ml.

Ejemplo E: Procedimiento y kit para vigilar a los pacientes tratados con el certolizumab

5 La prueba se realizó con suero o con plasma. Como el TNFα es inestable en solución, las muestras se utilizaron inmediatamente después de la toma de sangre o congeladas. Para evitar cualquier fijación inespecífica, se centrifugaron y filtraron las muestras que se habían congelado hacía más de 6 meses o que no eran transparentes.

#### 1. Dosificación del TNFα

Con un anticuerpo monoclonal anti-TNFα se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- 10
- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añaden los anticuerpos biotinilados anti-TNFα. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
  - A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-TNFα biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - 15
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de TNFα.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
  - 20
  - Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de TNFα de cada una de las muestras de pacientes expresada en pg/ml.

#### 2. Dosificación del certolizumab

Con el TNFα se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- 25
- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añade el anticuerpo anti-PEG biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
  - A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el anticuerpo anti-PEG biotinilado. Después de la incubación, se lavan los pocillos de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - 30
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de infliximab.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
  - 35
  - Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de certolizumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en µg/ml.

#### 3. Dosificación del anti-certolizumab

40 Con el certolizumab se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- Se añade el certolizumab biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante

lavado.

- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el certolizumab biotinilado. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 5
- La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el infliximab.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
  - Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.
- 10 Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el certolizumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

#### 4. Dosificación del anti-certolizumab (alternativa)

Con el certolizumab se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- 15
- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añaden el anti-IgG de humano biotinilado y el anti-IgM de humano biotinilado. Después de la incubación, se retiran los anticuerpos sin fijar mediante lavado.
- 20
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con anti-IgG de humano y anti-IgM de humano biotinilados. Después de la incubación, se lavan de nuevo los pocillos para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el infliximab.
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- 25
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el certolizumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

Ejemplo F: Procedimiento y kit para vigilar a los pacientes tratados con el golimumab

- 30 La prueba se realizó con suero o con plasma. Como el TNF $\alpha$  es inestable en solución, las muestras se utilizaron inmediatamente después de la toma de sangre o congeladas. Para evitar cualquier fijación inespecífica, se centrifugaron y filtraron las muestras que se habían congelado hacía más de 6 meses o que no eran transparentes.

#### 1. Dosificación del TNF $\alpha$

Con un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- 35
- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
  - Se añaden los anticuerpos biotinilados anti-TNF $\alpha$ . Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- 40
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
  - La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de TNF $\alpha$ .
  - La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.

- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de TNF $\alpha$  de cada una de las muestras de pacientes expresada en pg/ml.

## 5 2. Dosificación del golimumab

Con el TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 10 • Se añaden los anticuerpos biotinilados contra la IgG de humano. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con los anticuerpos anti-IgG biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 15 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de infliximab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

20 Un margen de calibración permite definir la cantidad de golimumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en  $\mu$ g/ml.

## 3. Dosificación del anti-golimumab

Con el infliximab se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- 25 • Se añade el golimumab biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el golimumab biotinilado. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- 30 • La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el infliximab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

35 Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el golimumab de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

Ejemplo G: actividad biológica del TNF $\alpha$

40 La actividad del TNF se evaluó mediante el ensayo citotóxico con células L929 (Bloquel C et al., (2004) *Hum Gene Ther.* 15: 189-201). Las diluciones seriadas de muestras de TNF de suero se incubaron con células L929 y se determinó el número de células supervivientes mediante el ensayo de muerte con MTT.

Los resultados demuestran que el TNF $\alpha$  de los pacientes tratados es inactivo, a saber, no provoca una lisis relevante de células L929.

Ejemplo H: Validación del procedimiento con una cohorte de más de 300 pacientes humanos

La prueba se realizó con suero o con plasma. Como el TNF $\alpha$  es inestable en solución, las muestras se utilizaron inmediatamente después de la toma de sangre o congeladas. Para evitar cualquier fijación inespecífica, se centrifugaron y se filtraron las muestras que se habían congelado hacía más de 6 meses o que no eran transparentes. Para cada paciente, la detección se llevó a cabo en diferentes momentos de tiempo durante el tratamiento.

### 1. Dosificación del TNF $\alpha$

Con un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  se reviste en una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- 10 • Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- Se añaden los anticuerpos biotinilados anti-TNF $\alpha$ . Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- 15 • A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de TNF $\alpha$ .
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- 20 • Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de TNF $\alpha$  de cada una de las muestras de pacientes expresada en pg/ml.

### 2. Dosificación del infliximab

Con el TNF $\alpha$  se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- 25 • Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- Se añaden los anticuerpos biotinilados contra la IgG de humano. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.
- 30 • A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con anticuerpos anti-IgG biotinilados. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de infliximab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- 35 • Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

Un margen de calibración permite definir la cantidad de infliximab de cada una de las muestras de pacientes expresada en  $\mu$ g/ml.

### 3. Dosificación del anti-infliximab

40 Con el infliximab se reviste una placa de microtitulación de poliestireno (4 tiras de 8 pocillos).

- Primero se añade la muestra diluida al pocillo revestido con el anticuerpo, lo que permite la fijación. Después de la incubación, las proteínas sin fijar se retiran mediante lavado.
- Se añade el infliximab biotinilado. Después de la incubación, los anticuerpos sin fijar se retiran mediante lavado.

- A continuación se añade la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La estreptavidina se fija al complejo formado con el infliximab biotinilado. Después de la incubación, los pocillos se lavan de nuevo para eliminar cualquier exceso de conjugado.
- La enzima fijada se revela mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el infliximab.
- La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) permite parar la reacción enzimática.
- Después de parar la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M), se lee la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm.

10 Un margen de calibración permite definir la cantidad de anticuerpos contra el infliximab de cada una de las muestras de pacientes expresada en ng/ml.

#### 4. Otros parámetros

- [PCR]: concentración de la proteína C reactiva, expresada en mg/l.
- VSG: velocidad de sedimentación globular, expresada en mm/h.
- Posología: para saber si la posología es normal o si la posología es mayor que la posología normal.
- 15 – Edad, sexo, peso.

#### 5. Factores de puntuación:

{TNF}: factor de puntuación del TNF, de acuerdo con la concentración medida del TNF. A modo de ejemplo:

El factor de puntuación para una medición de la muestra por debajo de 10 pg/ml es: 1.

El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 10 y 100 pg/ml es: 4.

20 El factor de puntuación para una medición de la muestra por encima de 100 pg/ml es: 10.

{anti-TNF}: factor de puntuación del anti-TNF, de acuerdo con la concentración medida del anti-TNF.

Para un paciente con una posología normal:

El factor de puntuación para una medición de la muestra por debajo de 0,1 µg/ml: 10.

El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 0,1 y 0,5 µg/ml: 6.

25 El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 0,5 y 1,8 µg/ml es: 4.

El factor de puntuación para una medición de la muestra por encima de 1,8 µg/ml: 1.

Para un paciente con un aumento de la posología:

El factor de puntuación para una medición de la muestra por debajo de 0,1 µg/ml: 12,5.

El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 0,1 y 0,5 µg/ml: 10.

30 El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 0,5 y 1,8 µg/ml es: 7,5.

El factor de puntuación para una medición de la muestra por encima de 1,8 µg/ml: 1,25.

{ACF}: factor de puntuación del ACF, de acuerdo con la concentración medida de los ACF.

El factor de puntuación para una medición de la muestra por debajo de 10 ng/ml: 1.

El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 10 y 200 ng/ml: 5.

35 El factor de puntuación para una medición de la muestra por encima de 200 ng/ml: 10.

{PCR}: factor de puntuación de la PCR, de acuerdo con la concentración de la proteína C reactiva proporcionada por el conjunto de datos clínicos.

El factor de puntuación para una medición de la muestra por debajo de 6 mg/l: 1.

El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 6 y 50 mg/l: 4.

El factor de puntuación para una medición de la muestra por encima de 50 mg/l: 10.

{VSG}: factor de puntuación de la VSG, de acuerdo con la velocidad de sedimentación globular, proporcionada por el conjunto de datos clínicos. La velocidad de sedimentación es dependiente «de la edad y del sexo».

5 El factor de puntuación para una medición de la muestra por debajo de 15 mm/h: 1.

El factor de puntuación para una medición de la muestra entre 15 y 20 mm/h: 4.

El factor de puntuación para una medición de la muestra por encima de 20 mm/h: 10.

#### 6. Ponderaciones

10 Cada factor de puntuación de cada parámetro está asociado a un factor de ponderación ( $W_n$ ) de acuerdo con el impacto de estos parámetros sobre el tratamiento.

A modo de ejemplo:

El factor de ponderación del TNF es: 15%.

El factor de ponderación del anti-TNF es: 30%.

El factor de ponderación de los ACF es: 35%.

15 El factor de ponderación de la PCR es: 10%.

El factor de ponderación de la VSG es: 10%.

#### 7. Resultados:

##### 7.1. Análisis de los pacientes con artritis reumatoide tratados con infliximab

20 Analizamos las muestras de suero de un paciente con artritis reumatoide tratado con infliximab en diferentes momentos durante el transcurso del tratamiento. Las cifras de la tabla A que viene a continuación muestran, para cada paciente:

- El nivel medido de: TNF, anti-TNF (infliximab) y ACF (anti-infliximab).
- La información del conjunto de datos clínicos: PCR, VSG y posología.
- El factor de puntuación para cada parámetro.

25 - El factor de ponderación para cada parámetro.

- El resultado de la puntuación de la vigilancia.

- La respuesta del paciente al tratamiento de acuerdo con el conjunto total de datos clínicos: respuesta (R), ninguna respuesta o respuesta incompleta (NR), comienzo del tratamiento (T0).

30 Los resultados consecutivos para cada paciente representan las mediciones en diferentes momentos durante el tratamiento.

Tabla A

Paciente	Medición del nivel de			Conjunto de datos clínicos			Factores de puntuación						Factores de ponderación					PUNTAJACIÓN	Respuesta al tratamiento
	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Posología	Const. vitales	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales	Posología	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales		
7	0	0	0	6	norm.	9	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>3,7</b>	TO
7	0	11,5	0	5,4	Norm.	10	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
7	0	1,3	0	5	Norm.	5	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,6</b>	R
20	0	0,0	67	5	Norm.	9	1	10	4	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>4,8</b>	NR
20	0	0,0	701	5	Norm.	16	1	10	10	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>7,2</b>	NR
20	0	0,0	42	5	Norm.	26	1	10	4	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>5,7</b>	NR
20	0	0,0	23	5	Norm.	20	1	10	4	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>5,1</b>	NR
21	0	0,0	0	5	Norm.	25	1	10	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>4,6</b>	TO
21	0	2,3	0	5,1	Norm.	53	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,9</b>	R
21	0,0	2,4	0,0	5	Norm.	34	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,9</b>	R
21	0	2,2	0	5	Norm.	22	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,9</b>	R
31	0	2,4	0	5	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
31	0,0	2,4	0,0	5	Norm.	1	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
31	0	0,0	47	11,4	Norm.	21	1	10	4	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>6,0</b>	NR
47	0	5,8	0	5	Norm.	6	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
47	0	93,4	0	5	Norm.	9	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
47	0	6,5	0	5	Norm.	4	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
47	0	41	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
49	0	5,2	0	24	Aum.	43	1	1	1	4	10	1,3	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>2,3</b>	R
49	0,0	5,2	0,0	6	Aum.		1	1	1	1	1	1,3	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,1</b>	R
49	0	0,0	0	22	Aum.	64	1	10	1	4	10	1,3	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>5,7</b>	NR
58	0	2,7	0	5	Norm.	3	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
58	0	0,6	0	5	Norm.	3	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,6</b>	R
58	0	1,9	0	6	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
67	75	0,0	54	15,5	Norm.	25	4	10	4	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>6,4</b>	NR
67	10	24,0	0,0	5	Norm.	2	4	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,5</b>	R
67	11	11,4	0	5	Norm.	3	4	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,5</b>	R
67	0	9,9	0	5	Norm.	3	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
86	0	0,0	0	6	Norm.	9	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>3,7</b>	TO
86	0,0	11,5	0,0	5	Norm.	1	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
86	0	3,8	0	5	Norm.	12	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,0</b>	R
86	0	2,0	0	5	Norm.	21	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,9</b>	R
89	0	2,0	0	5	Norm.	16	1	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	<b>1,3</b>	NR

Paciente	Medición del nivel de			Conjunto de datos clínicos			Factores de puntuación						Factores de ponderación					PUNTAJÓN	Respuesta al tratamiento
	TNF	Infiximab	ACF	PCR	Posología	Const. vitales	TNF	Infiximab	ACF	PCR	Const. vitales	Posología	TNF	Infiximab	ACF	PCR	Const. vitales		
89	0	5,8	0	14	Norm.	22	1	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	NR
89	0	5,0	0	6	Norm.	21	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	NR
91	0	0,2	0	16	Norm.	46	1	5	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,4	NR
91	0	0,3	0	17	Norm.	61	1	5	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,4	NR
91	0	0,2	0	25	Norm.	46	1	5	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,4	NR
105	0,0	2,6	0,0	8,7	Norm.	30	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
105	0	2,5	0	5,1	Norm.	27	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
105	0	2,6	0	7,9	Norm.	27	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
115	0	2,4	66	5	Norm.	7	1	1	4	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,1	R
115	0	21	0	6	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
116	0	0,0	0	12,7	Norm.	46	1	10	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,9	TO
116	11	18,9	0	5	Norm.	31	4	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,4	R
116	0	5,9	0	5	Norm.	67	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
117	0	0,9	0	5	Norm.	22	1	3	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,5	R
117	0	3,2	0	24	Norm.	41	1	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
117	0	2,1	0	5	Norm.	16	1	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
119	0	2,3	0	5	Norm.	29	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
119	0	1,5	11	5	Norm.	40	1	3	4	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,6	R
129	0	4,1	0	5	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
129	0	3,9	0	5	Norm.	2	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
129	0	4,3	0	5	Norm.	3	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
138	0	0,0	0	14	Norm.	28	1	10	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,9	TO
138	0	12,4	0	5	Norm.	11	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
138	0	9,9	0	5	Norm.	11	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
92	0	0,5	0	5	Norm.	38	1	5	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,1	NR
92	0	0,5	0	17	Norm.	51	1	5	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,4	NR
92	0	0,3	0	5	Norm.	26	1	5	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,1	R

Los resultados presentados en la tabla A de más arriba muestran que los pacientes que combinan (i) un TNFα indetectable o bajo, (ii) una cantidad de anti-TNF detectable y (iii) una cantidad de ACF esencialmente baja o ausente, responden al tratamiento. Con la puntuación y los factores de ponderación de más arriba, los pacientes con una puntuación por debajo de 3 se pueden clasificar como pacientes que responden. Para tales pacientes, se debe continuar con el tratamiento (aunque la dosificación se podría ajustar).

5

Todos los pacientes que tienen un valor de puntuación por encima de 5 se deben clasificar como «pacientes que escapan», a saber, pacientes en los que el tratamiento con anti-TNF fue eficaz, pero que se han convertido en pacientes que no responden. En estos pacientes, el tratamiento se debe cambiar rápidamente para evitar la degradación irreversible de las articulaciones.

10

Los pacientes entre 3 y 5 se deben vigilar atentamente. Estos pacientes se convierten poco a poco en pacientes que

no responden. Se debe ajustar el tratamiento (p. ej., dosificación o pauta de administración) y el posible cambio se debe considerar en función de la progresión.

5 Solo un paciente (el paciente n.º 89) con una puntuación por debajo de 3 era un paciente que no responde. De hecho, este paciente es desde el inicio un paciente que no responde, a saber, paciente en quien el tratamiento con anti-TNF nunca fue eficaz. Tales pacientes se pueden identificar con facilidad mediante la invención: tienen una puntuación similar a la de los pacientes que responden, pero tienen todos los signos clínicos de los pacientes enfermos. Se les debe cambiar el tratamiento.

#### 7.2 Análisis de los pacientes con enfermedades inflamatorias tratadas con el infliximab

10 También analizamos muestras de suero de enfermedades inflamatorias (espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, etc.). Los pacientes se trataron con el infliximab. Las muestras se analizaron en diferentes momentos durante el transcurso del tratamiento. Las cifras de la tabla B que viene a continuación muestran, para cada paciente:

- La cantidad medida de: TNF, anti-TNF (infliximab) y ACF (anti-infliximab).
- La información del conjunto de datos clínicos: PCR, VSG y posología.
- 15 – El factor de puntuación para cada parámetro.
- El factor de ponderación para cada parámetro.
- El resultado de la puntuación de la vigilancia.
- La respuesta del paciente al tratamiento de acuerdo con el conjunto total de datos clínicos: respuesta (R), ninguna respuesta o respuesta incompleta (NR), comienzo del tratamiento (T0).
- 20 Los resultados consecutivos para cada paciente representan las medidas en diferentes momentos durante el tratamiento.

Tabla B

Paciente	Medición del nivel de			Conjunto de datos clínicos			Factores de puntuación						Factores de ponderación					PUNTAJACIÓN	Respuesta al tratamiento
	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Posología	Const. vitales	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales	Posología	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales		
1	0	0,00	0	17	Norm.	35	1	10	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,9	TO
1	0	21,3	0	5	Norm.	16	1	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
1	0	26,6	0	5	Norm.	13	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
2	0	1,0	0	5	Norm.	4	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
2	0,0	0,8	0,0	5	Norm.	1	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
3	0	1,0	0	11	Norm.	40	1	3	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,8	R
3	0,0	1,6	0,0	5	Norm.	5	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
3	0	1,3	0	11	Norm.	27	1	3	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,8	R
4	0	2,5	0	5	Norm.	10	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
4	0,0	3,0	0,0	5	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
4	0	3,2	0	5	Norm.	10	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
11	0	1,9	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
11	0,0	1,7	0,0	5	Norm.	3	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
11	0	1,7	0	5	Norm.	5	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
13	0	0,00	1250	5	Norm.	1	1	10	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	6,9	NR
13	14	0,0	1660	5	Norm.	26	4	10	10	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	8,2	NR
13	0	0,2	12	5	Norm.	12	1	5	4	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,3	NR
14	0	1,6	0	6,8	Norm.	16	1	3	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
14	0	3,2	0	5	Norm.	6	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
15	0	0,2	0	5	Norm.	31	1	5	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,1	NR
15	0	1,0	0	7	Alto	36	1	3	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,7	R
15	0	1,6	0	5	Alto	20	1	3	1	1	4	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,1	R
16	0	4,0	0	5	Alto	41	1	1	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,0	R
18	0	2,6	0	5	Norm.	7	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
18	0	2,5	0	5	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
19	0	14,7	0	5	Norm.	1	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
19	0,0	18,3	0,0	5	Norm.	12	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
22	0	6,8	0	5	Norm.	21	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
22	0	5,4	0	5,8	Norm.	1	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
22	0	2,1	0	5	Norm.	18	1	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
23	0	13,8	0	5	Alto	2	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
23	0,0	11,1	0,0	5	Alto	10	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
23	0	9,1	0	5	Alto	12	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
24	0	2,8	0	5	Norm.	9	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	NR
24	0,0	4,0	0,0	5	Norm.	12	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	NR
24	0	7,0	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	NR
24	0	8,2	0	5	Norm.	7	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
25	0	0,3	0	5	Norm.	22	1	5	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,1	NR
26	0,0	9,7	0,0	5	Alto	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
26	0	10,8	0	5	Alto	9	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
27	0	3,3	0	10	Norm.	24	1	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
27	0,0	3,0	0,0	9,8	Norm.	22	1	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
27	0	3,8	0	9,5	Norm.	16	1	1	1	4	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
28	0	1,6	0	17,6	Norm.	6	1	3	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
28	145	2,3	0	5	Norm.	5	10	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,4	R
29	0	1,3	0	5	Norm.	17	1	3	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
29	0	1,2	0	5	Norm.	14	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
29	0	0,8	0	5	Norm.	14	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
32	0	1,6	0	8	Alto	17	1	3	1	1	4	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,1	NR
32	0,0	1,2	0,0	5	Alto	19	1	3	1	1	4	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,1	NR

Paciente	Medición del nivel de			Conjunto de datos clínicos			Factores de puntuación						Factores de ponderación					PUNTAJACIÓN	Respuesta al tratamiento
	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Posología	Const. vitales	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales	Posología	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales		
32	0	2,1	0	7	Alto	15	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	NR
33	0	18,2	0	5	Alto	8	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
33	12	16,2	0,0	5	Alto	14	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
33	10	>6	0	5	Alto	6	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
34	0	0,0	0	7	Norm.	22	1	10	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,6	TO
34	0	19,3	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
34	0,0	3,0	0,0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
34	0	0,1	0	5	Norm.	5	1	5	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
35	0	4,9	0	5	Alto	38	1	1	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,0	R
35	0,0	4,9	0,0	5	Alto	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
35	0	5,4	0	5	Alto	28	1	1	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,0	R
36	0	0,0	0	17,2	Norm.	1	1	10	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,0	TO
36	21	31,3	0,0	5	Norm.	5	4	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
36	0	9,2	0	6	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
36	0	6,1	0	5	Norm.	6	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
37	0	3,7	0	5	Norm.	4	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
37	0	3,4	0	5	Norm.	4	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
37	0	3,6	0	5	Norm.	9	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
38	0	3,3	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
38	0,0	2,5	0,0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
38	0	2,8	0	5	Norm.	7	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
39	0	0,7	0	5	Norm.	2	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
39	0,0	0,9	0,0	5	Norm.	4	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
39	0	1,0	0	5	Norm.	3	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
40	0	2,5	0	9	Alto	56	1	1	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,0	NR
40	0,0	2,6	0,0	5,7	Alto	12	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	NR
40	0	3,3	0	6,2	Alto	7	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	NR
41	0	2,8	0	65	Norm.	76	1	1	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,8	R
41	0	0,4	0	105	Norm.	110	1	5	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,0	NR
41	0	0,4	0	112	Norm.	96	1	5	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,0	NR
42	0	10	0	5	Norm.	10	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	NR
42	0	3,1	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
43	0	0,6	0	9	Norm.	7	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
43	0,0	2,1	0,0	6	Norm.	6	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
43	0	0,0	0	14	Norm.	16	1	10	1	4	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,3	NR
44	0	6,0	0	5	Norm.	3	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
44	0,0	2,6	0,0	5	Norm.	1	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
44	0	2,8	0	3	Norm.	2	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
45	0	7,8	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
45	0	2,5	0	5	Alto	8	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
45	0	5,2	0	5	Alto	6	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
45	0	4,4	0	6	Alto	7	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
46	0	0,0	610	5	Norm.	8	1	10	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	6,9	NR
46	12	0,0	848	5	Norm.	5	4	10	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	7,3	NR
46	0	0,0	895	5	Norm.	9	1	10	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	6,9	NR
48	0	1,3	0	5	Norm.	7	1	3	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,8	R
48	0,0	2,9	0,0	5	Norm.	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
48	0	0,4	0	19	Norm.	49	1	5	1	4	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,8	NR
50	0	1,3	0	5	Norm.	4	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
50	0	0,6	12	5	Norm.	3	1	3	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,8	R
50	0	1,6	0	5	Norm.	1	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
51	0	0,0	117	11	Norm.	9	1	10	4	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	5,1	NR
51	0,0	0,0	0,0	8,1	Norm.	8	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,7	NR
51	0	0,5	0	5	Norm.	10	1	5	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R

ES 2 548 533 T3

Paciente	Medición del nivel de			Conjunto de datos clínicos			Factores de puntuación					Factores de ponderación					PUNTAJACIÓN	Respuesta al tratamiento	
	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Posología	Const. vitales	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales	Posología	TNF	Infliximab	ACF	PCR			Const. vitales
52	19	0,0	0	12,5	Norm.	17	4	10	1	4	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,8	NR
52	0	7,0	0	5	Norm.	6	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
52	0	2,0	0	5	Norm.	11	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	NR
52	0	0,3	0	13	Norm.	12	1	5	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,5	R
52	0	0,1	0	9,6	Norm.	14	1	5	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,5	R
56	0	7,2	0	5	Alto	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
56	12	12,0	0,0	5	Alto	2	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
56	0	6,5	0	5	Alto	2	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
59	0	3,9	0	12,7	Norm.	11	1	1	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
59	0	>3	0	5	Norm.	18	10	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,7	R
59	0	4,2	0	5	Norm.	20	1	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
60	0,0	0,0	0,0	5	Norm.	8	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,7	TO
60	0,0	23,2	0,0	5	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
68	0	0,0	0	5	Norm.	1	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,7	TO
68	0	3,2	0	5	Norm.	9	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
68	0	5,5	0	5	Norm.	13	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
69	0	0,0	0	5,1	Norm.	10	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,6	TO
69	0,0	0,0	10	5	Norm.	12	1	10	4	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,8	R
69	0	0,0	607	5	Norm.	17	1	10	10	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	7,2	R
69	0	0,0	174	5	Norm.	19	1	10	4	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	5,1	R
70	0	10,4	0	5	Alto	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
70	0,0	9,4	0,0	5	Alto	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
71	0	0,3	0	6,3	Alto	49	1	5	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,5	NR
71	0	0,8	0	11	Alto	46	1	3	1	4	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,0	NR
72	0	0,0	0		Norm.	1	1	10	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,7	NR
72	22	0,0	930	59,6	Norm.	63	4	10	10	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	NR
72	10	0,0	8652	59	Norm.	68	4	10	10	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	NR
72	24	0,0	23831	63	Norm.	80	4	10	10	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	NR
73	1092	0,0	80622	5	Norm.	58	10	10	10	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	NR
73	995	0,0	191144	5	Norm.	38	10	10	10	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	NR
73	896	0,1	####	5	Norm.	60	10	5	10	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	7,8	R
73	488	0,0	95835	7,7	Norm.	58	10	10	10	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	NR
73	462	0,0	148001	8	Norm.	64	10	10	10	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	9,1	R
75	0	0,6	0	5	Norm.	8	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
75	0	1,5	0	5	Norm.		1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
75	0	3,2	0	5	Norm.	28	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
76	0	7,8	0	3	Alto	9	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
77	0	9,2	0	5	Norm.	10	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
77	0	2,8	0	5	Norm.	15	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
78	0	4,8	0	12	Alto	19	1	1	1	4	4	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,7	R
78	0	8,1	0	10,8	Alto	20	1	1	1	4	4	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,7	R
78	0	6,1	0	6,7	Alto	21	1	1	1	1	10	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,0	R
79	0	1,8	0	5	Norm.	4	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
80	0	3,2	0	5,6	Alto	3	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
80	11	5,0	0	5	Alto	3	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	NR
80	0	4,8	0	5	Alto	3	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	NR
80	0	2,8	0	5	Alto	3	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	NR
81	10	17,2	0	5	Alto	8	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
81	20	18,8	0	5	Alto	6	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
81	15	11,0	0	5	Alto	12	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
82	25	22,3	0	20	Norm.	22	4	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,7	R
82	24	18,4	0	36,4	Norm.	22	4	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,7	R
82	0	5,3	0	99,2	Norm.	24	1	1	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,8	R
83	0	3,6	0	12	Norm.	7	1	1	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R

Paciente	Medición del nivel de			Conjunto de datos clínicos			Factores de puntuación						Factores de ponderación					PUNTAJÓN	Respuesta al tratamiento
	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Posología	Const. vitales	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales	Posología	TNF	Infliximab	ACF	PCR	Const. vitales		
83	0	4,8	0	18	Norm.	8	1	1	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
83	0	2,9	0	11	Norm.	10	1	1	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
84	0	5,3	0	8	Norm.	4	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
84	0	3,9	0	9	Norm.	4	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
85	0	1,0	0	5	Norm.	14	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
85	0	0,8	0	5	Norm.	9	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
85	0	0,4	0	5	Norm.	3	1	5	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
87	0	0,8	0	5	Norm.	6	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
87	0	1,0	0	5	Norm.	20	1	3	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
93	0	2,4	0	18	Norm.	69,7	1	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
93	0	1,9	0	22	Norm.	29	1	1	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,2	R
93	0	2,0	0	16	Norm.	12	1	1	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
95	0	3,1	0	25	Norm.	8,3	1	1	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
95	0	3,7	0	5	Norm.	7	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
97	0,0	4,7	0,0	5	Norm.	3	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
97	0	13,3	0	5	Alto	3	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
97	0	10,8	0	5	Alto	1	1	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,1	R
99	27	13,9	0	5	Alto	12	4	1	1	1	1	1,25	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
102	0,0	1,0	0,0	7,8	Norm.	18	1	3	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
102	0	1,4	0	5	Norm.	20	1	3	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
102	0	0,5	0	5	Norm.	21	1	5	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,1	R
104	0,0	1,9	0,0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
104	0	1,9	0	5	Norm.	5	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
104	0	1,7	0	5	Norm.	6	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
108	0	0,6	0	5	Norm.	4	1	3	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,6	R
120	0,0	0,0	0,0	103	Norm.	76	1	10	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	5,5	TO
120	18	13,8	0	72,2	Norm.	57	4	1	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,3	R
120	0	2,2	0	72,2	Norm.	57	1	1	1	10	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,8	NR
120	0	0,1	0	39	Norm.	69	1	5	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,4	NR
122	197	0,0	711	6	Norm.	13	10	10	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	8,2	NR
122	62	0,0	84265	5	Norm.	14	4	10	10	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	7,3	NR
122	32	0,0	39638	6	Norm.	18	4	10	10	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	7,6	NR
123	0	0,0	0	28,7	Norm.	15	1	10	1	4	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	4,0	TO
123	15	18,7	0	6	Norm.	16	4	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,8	R
123	0	0,0	23	6	Norm.	16	1	10	4	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	5,1	NR
123	0	6,7	0	6	Norm.	16	1	1	1	1	4	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,3	R
123	0	0,0	2075	24	Norm.	30	1	10	10	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	8,1	NR
124	10	17,5	0	5	Norm.	4	4	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,5	R
124	0	8,4	0	5	Norm.	8	1	1	1	1	1	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,0	R
156	27	0,0	0	10,4	Norm.	32	4	10	1	4	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	5,4	NR
156	20	16,1	0	5	Norm.	35	4	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	2,4	R
156	0	9,7	0	9	Norm.	53	1	1	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	1,9	R
158	0	0,2	0	5	Norm.	26	1	5	1	1	10	1	0,15	0,3	0,35	0,1	0,1	3,1	NR

Los resultados presentados en la tabla B muestran que los pacientes que combinan (i) un TNFα bajo o indetectable, (ii) una cantidad de anti-TNF detectable y (iii) una cantidad de ACF esencialmente baja o ausente, responden al tratamiento. Con los factores de puntuación y ponderación anteriores, los pacientes con una puntuación por debajo de 5 de 3 se pueden clasificar como pacientes que responden. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Puntuación de vigilancia	Estado del paciente	
<3	Pacientes que responden	Continuar el tratamiento (se podrían ajustar los parámetros del tratamiento).  Se pueden identificar los pacientes que no responden desde el principio y se les puede cambiar a otro tratamiento sin anti-TNF*.
3 a 5	Posibles pacientes que escapan	Se debe vigilar atentamente a los pacientes. Se debe continuar el tratamiento, pero hay que tener en mente que se les podría cambiar.
>5	Pacientes que no responden	Cambio a otro tratamiento con anti-TNF.

\* Véanse a los pacientes 24, 32, 40 y 80. Para tales pacientes que no responden desde el principio, se especula que el TNF desempeña una función patógena menor en la actividad de la enfermedad.

- Nuestros resultados muestran que se puede discriminar a los pacientes que responden y a los que no responden.
- 5 Nuestros resultados muestran además que se puede anticipar la progresión de un paciente en un estado que responde a un estado en que no responde, con lo que se permite la implantación de una pauta terapéutica sustancialmente mejorada.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para inmunodetectar un anticuerpo contra un fármaco (ACF) en una muestra, en donde el fármaco es un anticuerpo terapéutico dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende:
  - 5 a) verificar la presencia del antígeno en la muestra;
  - b) si está presente, neutralizar el antígeno de la muestra; y
  - c) inmunodetectar la presencia o la cantidad de dicho ACF en dicha muestra.
2. Procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpo terapéutico, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento
 10 comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de:
  - el anticuerpo terapéutico,
  - el antígeno, y
  - los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico;
 para obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica la capacidad de respuesta a dicho
 15 tratamiento, y en donde los ACF se detectan de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha determinación se realiza mediante ELISA o inmunocaptura.
4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho antígeno es el TNF $\alpha$  y en donde el fármaco es preferiblemente un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  seleccionado de infliximab, etanercept,
 20 adalimumab, golimumab y certolizumab pegol.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el paciente tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que además comprende determinar, en una muestra de dicho paciente, la presencia o la cantidad de proteína C reactiva (PCR) o la velocidad de
 25 sedimentación globular (VSG).
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para vigilar o ajustar el tratamiento del paciente.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la muestra es una muestra de líquido corporal, preferiblemente una muestra de suero o plasma sanguíneo.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 para vigilar a un paciente que está en tratamiento con anti-TNF $\alpha$ , en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de:
  - el anticuerpo terapéutico,
  - el antígeno, y
  - los anticuerpos contra un fármaco dirigidos contra dicho anticuerpo terapéutico;
- 35 para obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente indica si el paciente responde al tratamiento o no, lo que permite un ajuste del tratamiento.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde si la concentración de TNF $\alpha$  está por debajo de 10 pg/ml, la concentración del anticuerpo terapéutico está por encima de 1  $\mu$ g/ml y la concentración del ACF está por debajo de 50 ng/ml, entonces el paciente es un paciente que responde y se debe continuar el tratamiento o incluso
 40 disminuirlo.
11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se determina la presencia o la cantidad de TNF $\alpha$  inactivo, en donde dicha presencia o cantidad es indicativa de la capacidad de respuesta del paciente al tratamiento.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en donde si la concentración de TNF $\alpha$  inactivo es superior a 10 pg/ml, entonces el paciente no está respondiendo al tratamiento.

5 13. Procedimiento para detectar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo terapéutico, en donde el anticuerpo terapéutico está dirigido contra el TNF $\alpha$ , en donde el procedimiento comprende determinar, en una muestra del paciente, la presencia o la cantidad de TNF $\alpha$  inactivo, en donde dicha presencia o cantidad es indicativa de que la capacidad de respuesta del paciente a dicho tratamiento es baja o está disminuyendo.

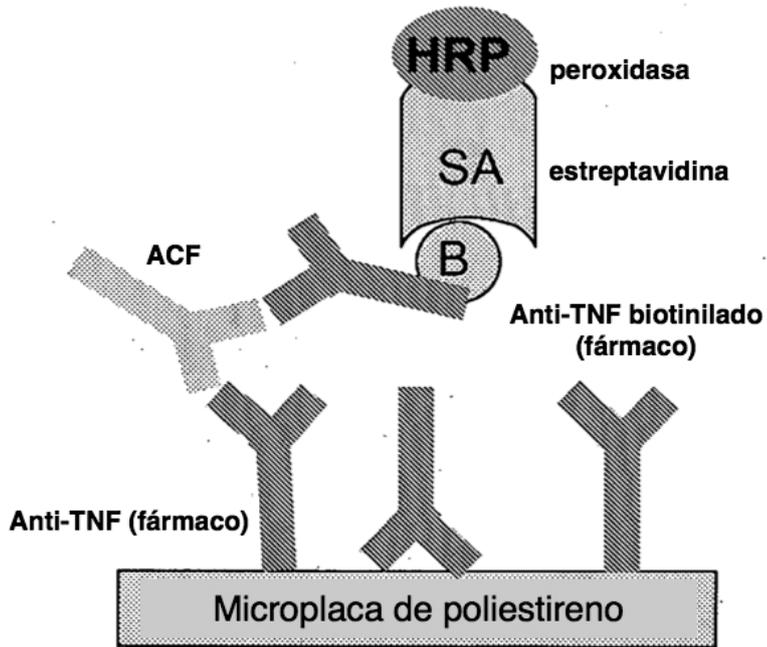


Fig 1

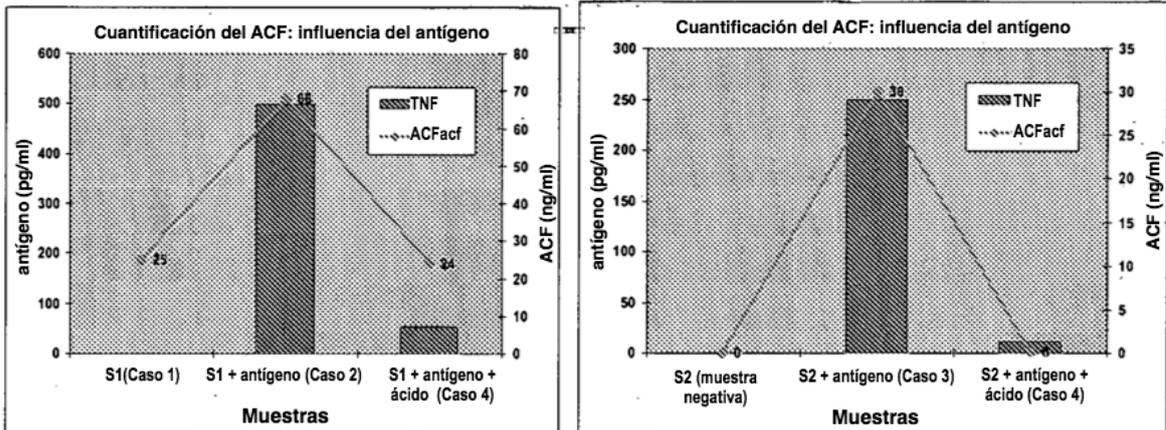
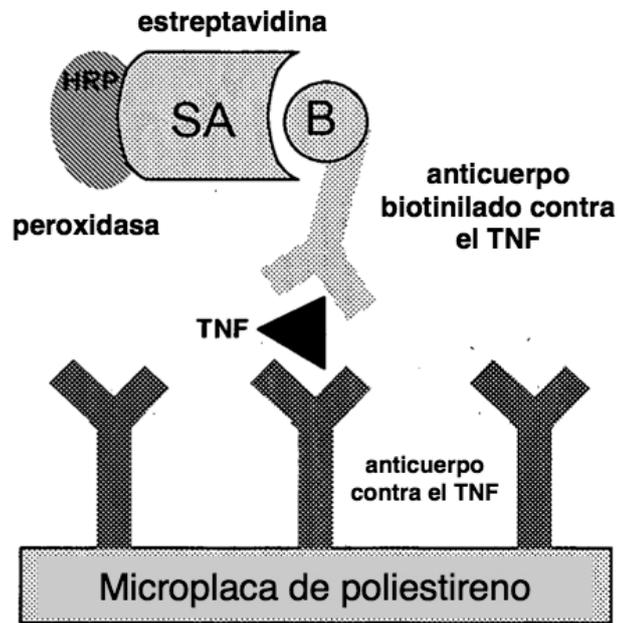
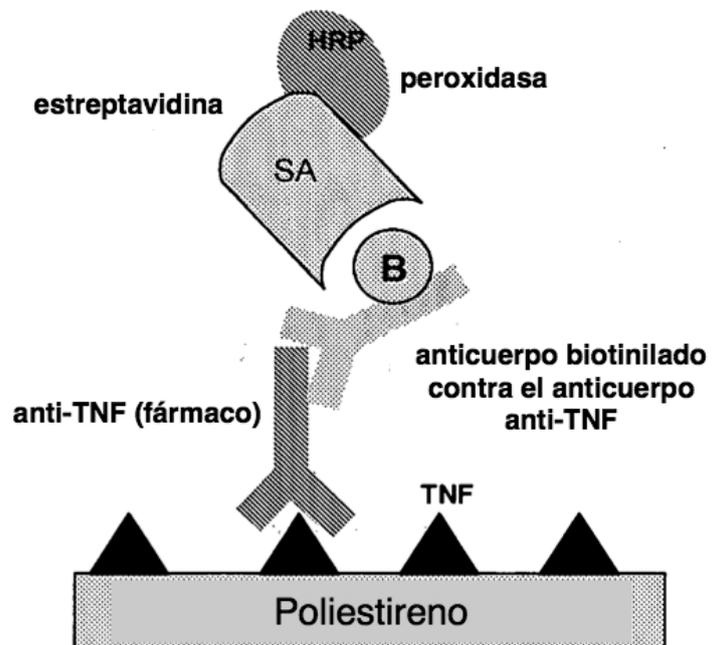


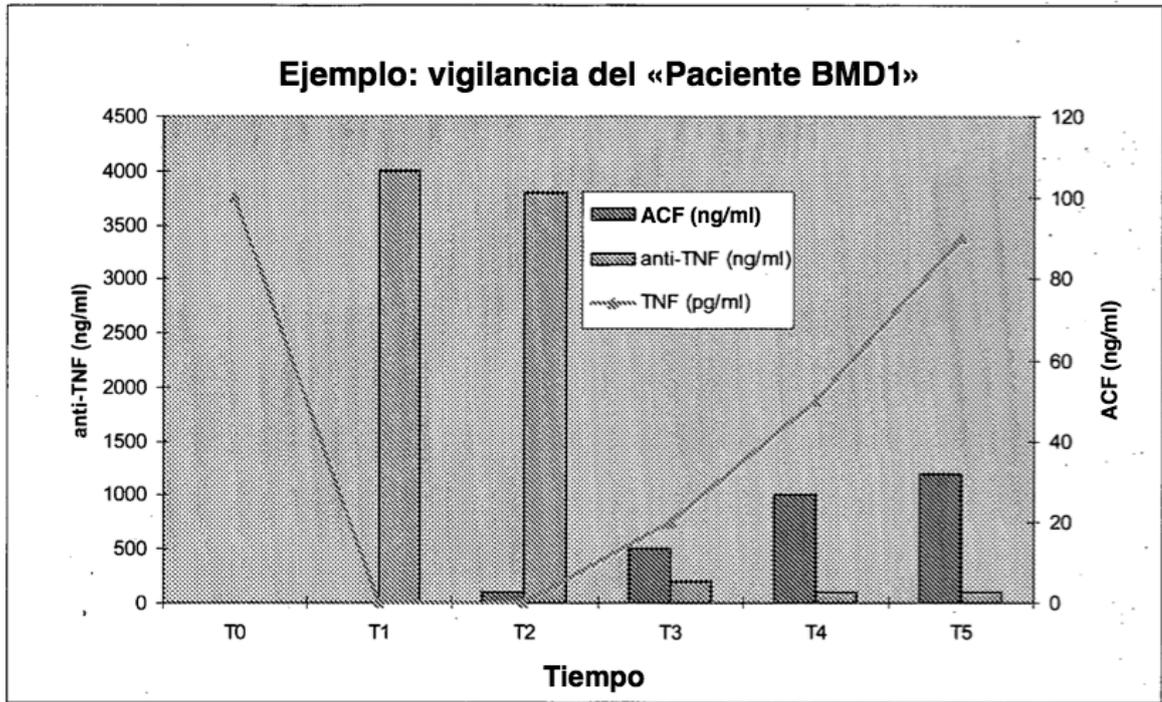
Fig 2



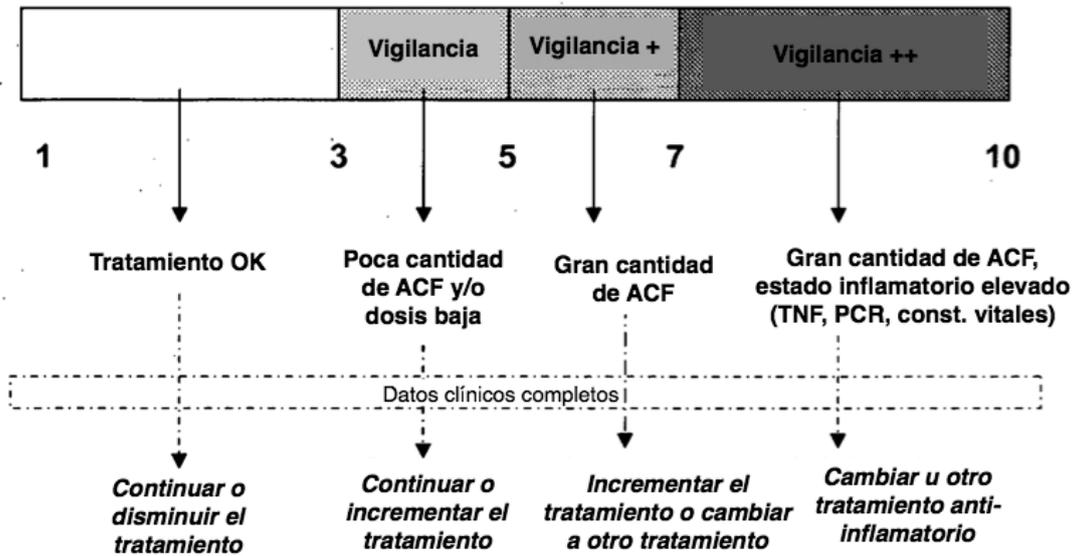
**Fig 3**



**Fig 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**