

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 864**

51 Int. Cl.:

C40B 30/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11746230 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2606362**

54 Título: **Ensayo para la medición de anticuerpos de unión a un anticuerpo monoclonal terapéutico**

30 Prioridad:

19.08.2010 EP 10173408

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

11.01.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GRUNERT, VEIT PETER;
KLAUSE, URSULA;
KUBALEC, PAVEL;
ROTHFUSS, MATTHIAS y
UPMEIER, BARBARA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 555 864 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

Ensayo para la medición de anticuerpos de unión a un anticuerpo monoclonal terapéutico

5 La invención se refiere a un método de inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo anti-<anticuerpo monoclonal terapéutico> (AC anti-<ACmT>) in vitro en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT). El método comprende las etapas de: (a) proporcionar un fragmento F(ab) de dicho ACmT unido a una fase sólida, (b) incubar la fase sólida proporcionada en (a) con la muestra, uniendo de esta manera el AC anti-<ACmT> a la fase sólida mediante el fragmento F(ab), (c) incubar la fase sólida obtenida en (b) con un anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h>, en la que dicho anticuerpo monoclonal se une al AC anti-<ACmT>, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgM que presenta un valor de la constante de disociación ($=K_D$) de entre aproximadamente 10^{-6} moles/l y 10^{-8} moles/l, y (d) detectar el anticuerpo monoclonal unido en (c) y determinar de esta manera el AC anti-<ACmT> en la muestra. La invención se refiere además a un método para la determinación de anticuerpos específicos de antígeno de una clase de inmunoglobulina particular mediante un inmunoensayo en un formato de matriz en el que se realiza in vitro la detección de un AC anti-<ACmT> de un ACmT en una muestra de sangre completa, plasma o suero obtenida de un paciente tratado con dicho ACmT. Se da a conocer además la utilización de dicho método para la detección de un anticuerpo anti-<ACmT> y para la identificación de un paciente en riesgo de desarrollar una reacción farmacológica adversa (RFA) durante el tratamiento con un ACmT.

20 Antecedentes de la invención

Desde el desarrollo de los primeros anticuerpos monoclonales por Koehler y Milstein en 1974, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de anticuerpos que resulten apropiados para la terapia en el ser humano. Los primeros anticuerpos monoclonales disponibles se desarrollaron en ratones y ratas. En los últimos diez años han llegado al mercado un número creciente de anticuerpos monoclonales quiméricos, anticuerpos monoclonales humanizados o anticuerpos monoclonales humanos.

30 Son ejemplos bien conocidos de anticuerpos monoclonales terapéuticos (=ACmT), abcximab (ReoPro®), adalimumab (Humira®), alemtuzumab (Campath®), basiliximab (Simulect®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), certolizumab pegol (Cimzia®), daclizumab (Zenapax®), eculizumab (Soliris®), efalizumab (Raptiva®), gemtuzumab (Mylotarg®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), infliximab (Remicade®), muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), natalizumab (Tysabri®), omalizumab (Xolair®), palivizumab (Synagis®), panitumumab (Vectibix®), ranibizumab (Lucentis®), rituximab (Rituxan®, MabThera®), trastuzumab (Herceptin®) y tositumomab (Bexxar®).

35 Se encuentran disponibles diferentes tipos de ACmT, algunos de los cuales podrían inducir reacciones farmacológicas adversas (RFA) o el fracaso del tratamiento secundario durante el tratamiento del paciente.

40 Los diversos tipos de ACmT disponibles actualmente comprenden anticuerpos quiméricos, por ejemplo infliximab (un AC anti-<FNT α >), anticuerpos humanizados, por ejemplo el certolizumab (un AC anti-<FNT α >) y anticuerpos humanos, por ejemplo el adalimumab (también un AC anti-<FNT α >) o el panitumumab (un AC anti-<receptor de factor de crecimiento epidérmico>).

45 Se encuentra en el mercado o actualmente en desarrollo un número bastante significativo de ACmT quiméricos, humanizados o humanos, que merecen investigación adicional. Son criterios importantes en estas investigaciones, la inducción de autoanticuerpos durante el tratamiento, reacciones farmacológicas adversas (RFA), la biodisponibilidad y la eliminación de los anticuerpos, entre muchos otros.

50 La autorización de la Agencia Europea del Medicamento (AEM) para el tratamiento del paciente con ACmT en el futuro también dependerá de los datos referentes a la formación de AC anti-<ACmT>.

Se han utilizado muchos métodos diferentes en la técnica anterior para la detección de los AC anti-<ACmT> y han conducido a resultados y consecuencias bastante diferentes e incluso conflictivos

55 Mire-Sluis A.R. et al., J. Immunol. Methods 289:1-16, 2004, resumen las recomendaciones de diseño y optimización de los inmunoensayos utilizados en la detección de anticuerpos anti-fármaco del huésped frente a anticuerpos terapéuticos producidos por la biotecnología (AC anti-<ACmT>). Según Mire-Sluis et al., los bien conocidos formatos de ensayo de anticuerpos anti-fármaco muestran desventajas considerables. Se mencionan ensayos de anticuerpos anti-fármaco en, por ejemplo, los documentos n° WO 2005/045058 y n° WO 90/006515. Se mencionan ensayos de anticuerpos anti-idiotípicos en, por ejemplo, la patente US n° 5.219.730, el documento n° WO 87/002778, y las patentes EP n° 0 139 389 y n° 0 170 302. Wadhwa M. et al., J. Immunol. Methods 278:1-17, 2003, informan de estrategias para la detección, medición y caracterización de anticuerpos no deseados inducidos por agentes terapéuticos biológicos.

65 Arden et al., Current Opinion in Immunology 20:431-435, 2008, han revisado la inmunogenicidad de los anticuerpos anti-<factor de necrosis tumoral> y mejorado los métodos de medición de anti-<anticuerpos>.

El sistema inmunológico, por ejemplo de un organismo de mamífero, produce anticuerpos que también se denominan inmunoglobulinas como respuesta a sustancias foráneas (no propias) o agentes infecciosos. Dichas sustancias no propias también se denominan antígenos. Un organismo de mamífero utiliza anticuerpos para defenderse frente a sustancias foráneas o agentes infecciosos.

5 Las inmunoglobulinas (Ig) pueden dividirse en cinco clases diferentes. Se distinguen inmunoglobulinas de clases M, G, A, E y D. Estas cinco clases de inmunoglobulina difieren cada una con respecto a la composición de la cadena pesada, que se denomina cadena μ , γ , α , ϵ o δ .

10 Cada clase de inmunoglobulina presenta una función diferente en el organismo. Las inmunoglobulinas de la clase M se observan al producirse un primer contacto con el antígeno, la denominada inmunización primaria. Sin embargo, la concentración de estas inmunoglobulinas se reduce después de dicha primera infección. Las inmunoglobulinas de la clase G en primer lugar se forman lentamente durante una inmunización primaria y se observan en grandes cantidades en el caso de que se produzca una segunda infección con el mismo antígeno. Las inmunoglobulinas de la clase A se observan sobre algunas de las superficies mucosales de los tejidos de mamífero y son responsables de que los procesos de defensa que se producen en las mismas. Las inmunoglobulinas de la clase E son responsables principalmente de las reacciones alérgicas. La función exacta de las inmunoglobulinas de la clase D hasta ahora es desconocida.

20 Las clases de inmunoglobulina individuales se observan en la sangre a concentraciones muy diferentes. Las inmunoglobulinas de la clase G (IgG) son las clase con la incidencia más alta en el suero humano, estando presentes en una proporción de aproximadamente 75%, que corresponde a un contenido sérico de aproximadamente 8 a 18 mg/ml. La segunda clase de inmunoglobulina más frecuente es la clase A (IgA), con una concentración sérica media habitualmente de entre 0,9 y 4,5 mg/ml. Las inmunoglobulinas de la clase M (IgM) normalmente se encuentran presentes a una concentración de entre 0,6 y 2,8 mg/ml, y las inmunoglobulinas de la clase D (IgD) se encuentran presentes a una concentración de habitualmente entre 0,003 y 0,4 mg/ml. Los anticuerpos IgE se encuentran presentes en la proporción más baja y sólo se observan a una concentración de entre 0,02 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$ en el suero.

30 Para el diagnóstico diferencial de muchas enfermedades resulta importante detectar los anticuerpos de una o más clases particulares de inmunoglobulina. Un diagnóstico satisfactorio en el caso de la infección vírica, bacteriana y parasitaria sólo puede garantizarse mediante una detección de anticuerpos específica de clase y/o mediante la exclusión de la medición interfiriente de determinadas otras clases de inmunoglobulina (por ejemplo la detección de anticuerpos IgG e IgA pero no la detección de anticuerpos IgM). Lo anterior resulta particularmente importante para diferenciar entre infecciones nuevas o agudas e infecciones más antiguas, así como para realizar un seguimiento clínico del curso de una infección. La detección específica de clase de los anticuerpos resulta especialmente importante para el VIH, la hepatitis A, la hepatitis B, la toxoplasmosis, la rubeola y las infecciones por clamidia. La detección específica de clase de los anticuerpos que son específicos para un determinado antígeno también resulta necesaria al determinar el título de los anticuerpos protectores, por ejemplo para comprobar si una inmunización ha tenido éxito.

45 Los anticuerpos específicos de antígeno de una clase particular con frecuencia se detectan mediante la unión de anticuerpos específicos de antígeno comprendidos en una muestra a una fase sólida recubierta con el antígeno específico. Las inmunoglobulinas (Ig) unidas específicamente a la fase sólida mediante el antígeno recubierto seguidamente se detectan con anticuerpos de detección dirigidos específicamente contra una determinada clase de Ig humana. Sin embargo, este tipo de procedimiento de ensayo sólo resulta posible en el caso de que todas las Ig no específicas, no unidas a antígeno, se desprendan mediante lavado antes de la reacción con los anticuerpos marcados específicos de clase dirigidos contra la Ig humana. De esta manera, por ejemplo al detectar moléculas de IgG específicas en una muestra, se encuentran presentes cantidades relativamente grandes (4 a 20 mg/ml de suero) de IgG no específicas que pueden unirse no específicamente a la fase sólida. En el caso de que se utilice un anticuerpo de detección contra IgG, dichas inmunoglobulinas unidas no específicamente también resultarán reconocidas y serán ligadas por el anticuerpo de detección. Lo anterior resulta en señales de fondo elevadas y proporciones de señal a ruido reducidas y, por último aunque no menos importante, en una menor sensibilidad.

55 Knight D. M. et al., Molecular Immunology 32:1271-1281, 1995, dan a conocer ensayos para la detección de anticuerpo antiqumérico humano (AAQH) y anticuerpo antimurino humano (AAMH), en los que dichos anticuerpos son reactivos con anticuerpos terapéuticos, mostrando que la inmunogenicidad del fragmento de región variable del anticuerpo Fab monoclonal murino 7E3 se reduce en el ser humano mediante la sustitución de regiones constantes humanas por murinas.

60 El documento nº WO 2009/003082 A2 da a conocer métodos y medios para la detección de anticuerpos en muestras de sangre del paciente contra anticuerpos monoclonales terapéuticos tales como el rituximab. Los fragmentos $F(ab)_2$ de rituximab se inmovilizaron en un soporte sólido y las muestras del paciente se sometieron a ensayo para anticuerpos ligantes de dichos fragmentos de rituximab utilizando conjugados de IgG, IgM, IgA e IgE antihumano con peroxidasa para la detección. Además, se da a conocer la utilización de Fab y/o anticuerpos monoclonales como reactivo inmunológico alternativo.

El documento nº EP 1 653 233 A1 da a conocer que pueden utilizarse anticuerpos monoclonales en la detección de Ig humanas. Dichos anticuerpos monoclonales se utilizan en la detección específica de clase de anticuerpos de Ig humana.

5 En el documento nº US2006/0115907A1 se describen anticuerpos específicos de complejo inmunológico para una sensibilidad incrementada en ensayos de matriz inmunológica. Los anticuerpos específicos de complejo inmunológico son anticuerpos de tipo factor reumatoide que preferentemente se unen a inmunoglobulinas agregadas u oligomerizadas, pero no a inmunoglobulinas individuales. La patente EP nº 1098198 (Berti et al.) se refiere a un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos IgG humanos en inmunoensayos enzimáticos. En dicho ensayo, se utiliza un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a anticuerpos IgG humanos mediante un neoepítipo formado con la unión de un anticuerpo a su antígeno. En dicho método no se describe una reducción de la señal de fondo debido a anticuerpos unidos no específicamente a la fase sólida.

10 15 Un método para reducir las señales de fondo es modificar la fase sólida con el fin de evitar la unión no específica de las inmunoglobulinas y utilizar aditivos tamponadores especiales que pretenden reducir o evitar la unión no específica de las inmunoglobulinas a la fase sólida (ejemplos: fase sólida HydroGel (Perkin Elmer), portaobjetos FAST (Schleicher & Schull), detergentes y sales caotrópicas). Las modificaciones de la fase sólida son laboriosas y caras. Además, se ha constatado que los aditivos tamponadores pueden reducir la reactividad de algunos anticuerpos y de esta manera reducir también las señales positivas deseadas.

20 Tal como se ha indicado, las señales de fondo inducidas por inmunoglobulinas unidas no específicamente incrementa el valor del blanco, lo que dificulta la detección de los anticuerpos unidos específicamente. Lo anterior es especialmente aplicable a los sistemas de ensayo miniaturizados, tales como inmunoensayos en un formato de matriz. Dichas matrices pueden comprender una pluralidad de ensayos específicos, en algunos casos incluso en diferentes formatos de ensayo, y el procedimiento de ensayo se lleva a cabo en un único recipiente de reacción. De esta manera, por ejemplo, la adición de un determinado detergente puede suprimir la unión no específica de anticuerpos a un primer analito en dicho ensayo, aunque el mismo detergente puede no presentar ningún efecto o incluso el efecto contrario en otro ensayo de detección de un segundo analito en el mismo sistema de matriz.

25 30 La utilización del factor de coagulación C1q, que es una subunidad del primer componente del complemento, como posibilidad adicional para reducir las señales de fondo en los inmunoensayos se da a conocer en la patente nº EP 0222146 B1. En la patente US nº 5.698.449 A1, se da a conocer un fragmento de C1q para eliminar selectivamente los complejos inmunológicos de la sangre y para detectar y cuantificar los complejos inmunológicos. La patente US nº 4.062.935 A1 describe la adición de factores reumatoides o C1q a la muestra y la unión y cuantificación de los complejos inmunológicos resultantes. Sin embargo, la técnica anterior no muestra ninguna aplicación de C1q a inmunoensayos en un formato de matriz.

35 40 Un elemento característico de los inmunoensayos en un formato de matriz es la fase sólida. En dichos inmunoensayos basados en una matriz, la fase sólida consiste preferentemente de áreas de ensayo localizadas, definidas y discretas. Estas áreas de ensayo sobre la fase sólida preferentemente se encuentran espacialmente separadas entre sí por áreas inertes. Estas áreas de ensayo discretas localizadas en la mayoría de casos son puntos y preferentemente presentan un diámetro de entre 10 µm y 1 mm y particularmente preferentemente un diámetro de entre 100 y 200 µm. Los sistemas de matriz se describen en, por ejemplo, Ekins R.P. y Chu F.W. (Clin. Chem. 37:1955-1967, 1995) y en las patentes US nº 5.432.099, nº 5.516.635 y nº 5.126.276.

45 Los sistemas de matriz presentan la ventaja de que pueden llevarse a cabo varias determinaciones de analito simultáneamente en una muestra. La fase sólida de estos sistemas de matriz puede recubrirse preferentemente con un ligante universal como estreptavidina o avidina, tal como se da a conocer en la patente EP nº 0939319 (Hornauer et al.). Resulta posible aplicar una pluralidad de parejas de unión, tales como anticuerpos específicos de antígeno a las áreas o puntos de ensayo individuales sobre la fase sólida (soporte sólido). En el caso de que se utilice, por ejemplo, estreptavidina, como matriz de unión universal, cada pareja de unión puede biotinilarse y fácilmente aplicada/unida a dicha fase sólida. Los componentes de la muestra y en particular las IgG pueden unirse no específicamente a una o más de dichas parejas de unión o a la fase sólida. En este caso resulta prácticamente imposible identificar un aditivo tamponador universal para reducir las señales de fondo, ya que cada pareja de unión individual podría requerir un aditivo tamponador muy particular. Los aditivos tamponadores que presentan efectos positivos en el caso de una pareja de unión pueden presentar incluso efectos negativos sobre otras parejas de unión. También resulta muy difícil modificar la fase sólida para numerosas parejas de unión diferentes.

50 55 60 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es desarrollar un método sensible para la detección de un anticuerpo anti-<anticuerpo monoclonal terapéutico> (AC anti-<ACmT>) en una muestra obtenida de un paciente tratado con dicho ACmT.

65 Inesperadamente ha resultado que la utilización del método de inmunoensayo según la presente invención permite la detección muy precoz de AC anti-<ACmT> y, de esta manera, también permite identificar la mayoría de aquellos pacientes en riesgo de desarrollar una reacción farmacológica adversa (RFA) durante el tratamiento con un ACmT.

Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a un método de inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo anti-anticuerpo monoclonal terapéutico (anti-ACmT) in vitro en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT), comprendiendo el método: a) proporcionar un fragmento F(ab) de dicho ACmT unido a una fase sólida, b) incubar la fase sólida proporcionada en (a) con la muestra, uniéndose de esta manera el AC anti-ACmT a la fase sólida mediante el fragmento F(ab), c) incubar la fase sólida obtenida en (b) con un anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h>, en la que dicho anticuerpo monoclonal se une al AC anti-ACmT, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgM que presenta un valor de la constante de disociación (=K_D) de entre aproximadamente 10⁻⁶ moles/l y 10⁻⁸ moles/l, y d) detectar el anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h> unido en (c) y determinar de esta manera el AC anti-ACmT en la muestra.

En una realización, la presente invención se refiere a la utilización del método de inmunoensayo para la identificación de un paciente en riesgo de desarrollar una reacción farmacológica adversa (RFA) mediante la determinación de un AC anti-ACmT in vitro en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT). El método comprende: a) proporcionar un fragmento F(ab) de dicho ACmT unido a una fase sólida, b) incubar la fase sólida proporcionada en (a) con la muestra, uniéndose de esta manera el AC anti-ACmT a la fase sólida mediante el fragmento F(ab), c) incubar la fase sólida obtenida en (b) con un anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h>, en la que dicho anticuerpo monoclonal se une al AC anti-ACmT, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgM que presenta un valor de la constante de disociación (=K_D) de entre aproximadamente 10⁻⁶ moles/l y 10⁻⁸ moles/l, y d) detectar el anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h> unido en (c) y determinar de esta manera el AC anti-ACmT en la muestra durante el tratamiento con un ACmT, en el que el paciente con un resultado positivo en el ensayo para AC anti-ACmT en el método se encuentra en riesgo de desarrollar una RFA.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de inmunoensayo según la presente invención para seleccionar un anticuerpo terapéutico alternativo para un paciente bajo tratamiento con un primer ACmT, en el que se encuentra disponible por lo menos un primer y uno o más ACmT alternativos, que comprende: a) determinar in vitro un AC anti-ACmT contra el primer ACmT en una muestra procedente de un paciente tratado con dicho primer ACmT, y b) seleccionar un ACmT alternativo para la terapia futura, en caso de que se encuentre presente un AC anti-ACmT contra dicho primer ACmT.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.L. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., editores, 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., editores, 1994).

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Singleton P. y Sainsburg D. et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2a ed., J. Wiley & Sons, New York, N.Y., 1994; March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y. 1992; Lewin B., Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994, (ISBN 0-19-854287 9); Kendrew J. et al. (editores), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994, ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8) que proporcionan al experto en la materia una guía general a muchos de los términos y expresiones utilizados en la presente solicitud.

Todas las referencias citadas en la presente memoria, incluyendo solicitudes y publicaciones de patente, patentes se incorporan como referencia en su totalidad.

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado a los mismos en la presente sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o a más de un anticuerpo. El término "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente puede encontrarse presente uno o más objetos adicionales. A título de ejemplo, una matriz que comprende por lo menos dos áreas discretas puede comprender opcionalmente dos o más áreas de ensayo discretas.

La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente 1 a 20, resultando preferentes también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.

5 La expresión "de interés" se refiere a un analito o sustancia de posible relevancia que debe analizarse o determinarse.

10 La "detección" incluye cualesquiera medios de detección, incluyendo las detecciones directa e indirecta. El término "detección" se utiliza en el sentido más amplio, incluyendo mediciones tanto cualitativas como cuantitativas de un analito, en la presente memoria mediciones de un analito, tal como un anticuerpo anti-<anticuerpo terapéutico>. En un aspecto, se utiliza un método de detección tal como se indica en la presente memoria, con el fin de identificar la mera presencia de un analito de interés en una muestra. En otro aspecto, el método puede utilizarse para cuantificar una cantidad de analito en una muestra.

15 El término "correlacionar" o "correlacionado" se refiere a la comparación, de cualquier manera, entre el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo y el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, pueden utilizarse los resultados de un primer análisis o protocolo al llevar a cabo un segundo protocolo, y/o pueden utilizarse los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si debería llevarse a cabo un segundo análisis o protocolo.

20 La expresión "reducir o inhibir" se refiere a disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia. La expresión "reducir o inhibir" se refiere a la capacidad de causar una reducción global preferentemente de 20% o superior, más preferentemente de 50% o superior, y todavía más preferentemente de 75%, 85%, 90%, 95% o superior. Reducir o inhibir puede referirse a los síntomas del trastorno bajo tratamiento.

25 El término "muestra" o "muestra de ensayo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica para el propósito de la evaluación in vitro obtenida de un paciente. La muestra puede comprender anticuerpos que se unen al anticuerpo o fármaco con el que ha sido tratado el paciente, tal como anticuerpo humano anti-<anticuerpo quimérico> (AAQH) o anticuerpo humano anti-<anticuerpo humano> (AHAH), siendo ambos AC anti-<ACmT>. El término "muestra", o "muestra de ensayo" incluye muestras biológicas que han sido manipuladas de cualquier manera tras su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, la solubilización, o el enriquecimiento en determinados componentes, tal como proteínas o polinucleótidos. Típicamente la muestra es una muestra líquida.

35 La muestra biológica puede ser, por ejemplo, sangre completa, suero, anticuerpos recuperados del paciente o plasma. La muestra preferentemente es de sangre completa, suero o plasma. La muestra biológica puede comprender anticuerpos recuperados del paciente. En una realización, la muestra es una muestra clínica. En otra realización, la muestra se utiliza en un ensayo diagnóstico.

40 En una realización, se obtiene una muestra de un sujeto o paciente antes de la terapia con anticuerpos monoclonal terapéutico (ACmT). En una realización, se obtiene una muestra de un sujeto o paciente antes de la terapia de ACmT. En una realización, se obtiene una muestra de un sujeto o paciente después de por lo menos un tratamiento con un ACmT.

45 En el caso de que se indique en la presente memoria que debe obtenerse una muestra en la semana 2, la muestra puede obtenerse entre el día 9 y el día 21 tras el inicio de la terapia con dicho ACmT. En el caso de que se indique en la presente memoria que debe obtenerse una muestra en la semana 6, la muestra puede obtenerse entre el día 28 y el día 64 tras el inicio de la terapia. En el caso de que se indique en la presente memoria que debe obtenerse una muestra en la semana 14, la muestra puede obtenerse entre las semanas 13 y 16 tras el inicio de la terapia.

50 Una "muestra de referencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier muestra, estándar o nivel que se utilice con fines comparativos. En una realización, se obtiene una muestra de referencia de un sujeto o paciente no tratado. En otra realización se obtiene una muestra de referencia de un individuo sano y/o no enfermo que no es el sujeto o paciente. En otra realización se obtiene una muestra de referencia de un individuo no tratado que no es el sujeto o paciente. En determinadas realizaciones, una muestra de referencia es una única muestra o múltiples muestras combinadas del mismo sujeto o paciente que se obtienen en uno o más puntos temporales diferentes de cuando se ha obtenido la muestra de ensayo. Por ejemplo, se obtiene una muestra de referencia del mismo sujeto o paciente en un punto temporal anterior a cuando se ha obtenido la muestra de ensayo. En determinadas realizaciones, una muestra de referencia incluye todos los tipos de muestras biológicas definidas anteriormente bajo el término "muestra", la cual se obtiene de uno o más individuos que no son el sujeto o paciente. En determinadas realizaciones, una muestra de referencia es la combinación de múltiples muestras de uno o más individuos sanos que no son el sujeto o paciente. En determinadas realizaciones una muestra de referencia es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo artritis reumatoide) que no son el sujeto o paciente. En determinadas realizaciones, una muestra de referencia es la agrupación de muestras de plasma o suero procedentes de uno o más individuos que no son el sujeto o paciente. En determinadas realizaciones, una muestra de referencia es la agrupación de muestras de plasma o suero procedentes de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno que no son el sujeto o paciente.

Tal como apreciará el experto en la materia, el método de inmunoensayo según la presente invención se lleva a cabo in vitro. Posteriormente se descarta la muestra del paciente. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método diagnóstico in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere nuevamente al cuerpo del paciente.

5 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos.

10 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de muchas especies de vertebrados pueden ser de dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa y lambda. Esta clasificación y nomenclatura se basa en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

15 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se dividen en clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

20 La notación de un anticuerpo se escribe de manera que el antígeno, que es ligado específicamente por el anticuerpo, se indica dentro de "<...>", por ejemplo un anticuerpo contra el antígeno "X" se indica como "anticuerpo anti-<X>".

25 La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')₂ que presenta dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

30 El fragmento "Fab" contiene los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, aunque también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada.

35 Los fragmentos "Fab" difieren de los fragmentos Fab en que presentan además de unos cuantos residuos aminoácidos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo Fab' originalmente se producen como parejas de fragmentos Fab' (F(ab')₂) que presentan un puente de cistinas de bisagra entre ellas. El monómero de Fab' se obtiene a partir de F(ab')₂ mediante reducción del puente de cisteínas.

40 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios se encuentran presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de los fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plücker, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York, páginas 269-315, 1994.

45 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un conector excesivamente corto para permitir el apareamiento los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el apareamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen en mayor detalle en, por ejemplo, la patente EP n° 404 097, en el documento n° WO 93/11161 y en Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993.

50 Un "fragmento F(ab)" según la presente invención incluye Fab, Fab', scFv y diacuerpos. Los fragmentos Fab o Fab' de un ACmT se producen mediante el procesamiento de dicho ACmT, por ejemplo mediante digestión del ACmT en fragmentos Fab o F(ab')₂ y una parte Fc, respectivamente. En el caso de que un anticuerpo terapéutico sea un scFv o un diacuerpo, estas moléculas no necesitan digerirse adicionalmente sino que pueden utilizarse sin modificación en el método de inmunoensayo según la presente invención.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal" (MAb) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden encontrarse presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal presenta como diana un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter

del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben utilizarse según la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler G. et al., *Nature* 256:495-497, 1975, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson T. et al., *Nature* 352:624-628, 1991, y en Marks J.D. et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, por ejemplo.

Entre los anticuerpos monoclonales en la presente memoria se incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos fragmentos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente US nº 4.816.567, y Morrison S.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984).

Las formas "humanizadas" de anticuerpo no humanos (por ejemplo murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata, el conejo o primates no humanos, que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de los bucles hipervariables que corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las FR corresponden a las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles ver Jones P.T. et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann L. et al., *Nature* 332:323-329, 1988, y Presta L.G., *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido preparado utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos tales como las dadas conocer en la presente memoria. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca fágica, en la que la biblioteca fágica expresa anticuerpos humanos (Vaughan T.J. et al., *Nature Biotechnology* 14:309-314, 1996; Sheets M.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom H.R. y Winter G., *J. Mol. Biol.* 227:381-388, 1992; Marks J.D. et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). También pueden generarse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Con el reto, se observa la producción de anticuerpos humanos, que es estrechamente similar a la observada en el ser humano en todos los aspectos, incluyendo la reorganización génica, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe en, por ejemplo, las patentes US nº 5.545.807, nº 5.545.806, nº 5.569.825, nº 5.625.126, nº 5.633.425 y nº 5.661.016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks J.D. et al., *Bio/Technology* 10:779-783, 1992; Lonberg N. et al., *Nature* 368:856-859, 1994; Morrison S.L., *Nature* 368:812-813, 1994; Fishwild D.M. et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851, 1996; Neuberger M., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996; Lonberg N. y Huszar D., *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, 1995. Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante immortalización de linfocitos B humanos productores de un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (estos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Ver, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77, 1985; Boerner P. et al., *J. Immunol.* 147(1):86-95, 1991, y la patente US nº 5.750.373.

La expresión "anticuerpo terapéutico" se refiere a un anticuerpo que se somete a ensayo en estudios clínicos para la autorización como terapéutico humano y que puede administrarse en un individuo para el tratamiento de una enfermedad. En una realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal. En una realización adicional, el anticuerpo terapéutico se obtiene de uno de los grandes simios o de un animal transformado con un locus de anticuerpo humano o un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado. En una realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal humano. En una realización adicional, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal humanizado. Se están utilizando ampliamente anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como enfermedades oncológicas, enfermedades inmunológicas, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades vasculares, enfermedades inflamatorias crónicas o enfermedades infecciosas. Dichos anticuerpos son, por ejemplo, anticuerpos contra CD20, CD22, HLA-

DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Y de Lewis, receptor de IL-6 (IL6R), TNF α , o receptor de IGF-1 (IGF1R). También se describen anticuerpos terapéuticos en Groner B. et al., Curr. Mol. Meth. 4:539-547, 2004, y en Harris M., Lancet Oncol. 5:292-302, 2004.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-<anticuerpo terapéutico>" es un anticuerpo que liga un anticuerpo terapéutico. Un "anticuerpo anti-<anticuerpo monoclonal terapéutico>" (AC anti-<ACmT>) es un anticuerpo que se une a un anticuerpo monoclonal terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-<infiximab> es un anticuerpo que se une al infiximab, un anticuerpo monoclonal terapéutico, con diana en el FNT α .

10 Un anticuerpo que "se une específicamente" o que es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es uno que se une a dicho polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

15 Un polipéptido "aislado" o un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido o anticuerpo, y entre ellos pueden incluirse enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. En realizaciones preferentes, el polipéptido o anticuerpo se purifica (1) a más de 95% en peso de polipéptido o anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, y más preferentemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido o anticuerpo aislado incluye el polipéptido o anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que no se encontrará presente por lo menos un componente del ambiente natural del polipéptido. Sin embargo, habitualmente el polipéptido o anticuerpo aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

25 El término "sujeto" o "paciente" se refiere a un mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto o paciente es un ser humano.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen la prevención de la aparición o de la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o mitigación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los métodos de la invención resultan útiles en el intento de retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno, especialmente una reacción farmacológica adversa.

40 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que resulta eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agente terapéutico se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, aunque no necesariamente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o durante un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

50 El término "diagnóstico" se utiliza en la presente memoria para referirse a la identificación de un estado molecular o patológico, enfermedad o condición, o para referirse a la identificación de un paciente que podría beneficiarse de un régimen de tratamiento particular. El término "pronóstico" se utiliza en la presente memoria para referirse a la predicción de la probabilidad de beneficio clínico de una terapia. El término "predicción" se utiliza en la presente memoria para referirse a la probabilidad de que un paciente responda favorablemente o desfavorablemente a una terapia particular. En una realización, la predicción se refiere al grado de dichas respuestas. En una realización, la predicción se refiere a la posibilidad y/o probabilidad de que un paciente sobreviva o mejore tras un tratamiento, por ejemplo un tratamiento con un agente terapéutico particular, y durante un periodo de tiempo determinado sin recurrencia de la enfermedad. Los métodos predictivos de la invención pueden utilizarse clínicamente para realizar decisiones de tratamiento seleccionando las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas en la predicción de si un paciente es probable que responda favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como un régimen terapéutico dado, incluyendo, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico o combinación dado, intervención quirúrgica, tratamiento de esteroides, etc., o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente tras un régimen terapéutico. El término "seleccionar" y "selección" se utilizan en la presente memoria para referirse a una

elección de entre varias alternativas. Un ejemplo de una "selección" es el procedimiento de selección de un ACmT de entre dos o más ACmT disponibles para el tratamiento de una enfermedad.

La "respuesta del paciente" puede evaluarse utilizando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el paciente, incluyendo, aunque sin limitación, (1) inhibición, en cierto grado, de la progresión de la enfermedad, incluyendo el enlentecimiento y la detención completa, (2) reducción del tamaño de la lesión, (3) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la infiltración celular patológica en órganos y/o tejidos periféricos contiguos, (4) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la expansión de la enfermedad, (5) alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados al trastorno, (6) incremento de la duración de la presentación sin enfermedad tras el tratamiento, y/o (7) mortalidad reducida en un punto temporal dado tras el tratamiento.

Las "reacciones farmacológicas adversas" (RFA) describen los daños asociados a la utilización de medicaciones determinadas a una dosis normal. Las RFA pueden ser locales, es decir, limitadas a una localización determinada, o sistémicas, en las que una medicación ha causado las RFA en todo el organismo y son medibles, por ejemplo, de la circulación. Las RFA pueden clasificarse según la causa (tipo A: efectos farmacológicos incrementados - dependientes de la dosis y predecibles (intolerancia, efectos secundarios), tipo B: efectos raros (o idiosincráticos) independientes de la dosis e impredecibles; tipo C: efectos crónicos; tipo D: efectos retardados; tipo E: efectos de final de tratamiento, o de tipo F: fracaso de la terapia), o según la gravedad. La FDA estadounidense define una "reacción farmacológica adversa" (RFA) grave como una en la que el resultado clínico es uno de los siguientes: muerte, potencialmente letal, hospitalización (inicial o prolongada), discapacidad (significativa, persistente o cambio permanente, alteración, daño o disrupción de la función/estructura corporal del paciente, actividades físicas o calidad de vida), anomalía congénita, requiere la intervención para evitar alteraciones o daños permanentes. Aunque no existe ninguna escala oficial para expresar el riesgo farmacológico global, el sistema de evaluación de riesgo farmacológico iGuard (www.iguard.org) es una escala de evaluación de cinco colores: rojo (alto riesgo), naranja (riesgo elevado), amarillo (riesgo controlado)

), azul (riesgo general), verde (riesgo bajo). Las RFA comprenden además las reacciones a la infusión. Entre estas reacciones a la infusión se incluyen, por ejemplo, urticaria, hipotensión, opresión en el pecho, enrojecimiento o presión sanguínea reducida.

La "falta de eficacia" (FE) se define como una actividad elevada de la enfermedad a pesar del tratamiento bajo condiciones que de otra manera se consideran adecuadas, por ejemplo con una cantidad habitualmente eficaz de un agente terapéutico.

La "eficacia del tratamiento" es una medida de la capacidad de una intervención de producir un efecto clínico beneficioso deseado bajo condiciones promedio de aplicación, habitualmente determinada en estudios de resultado no aleatorizados. La eficacia del tratamiento puede resultar afectada por la FE y/o el cumplimiento de los pacientes.

El término "beneficio" se utiliza en el sentido más amplio y se refiere a cualquier efecto deseado e incluye específicamente el beneficio clínico tal como se define en la presente memoria. El beneficio clínico puede medirse mediante la evaluación de diversos criterios finales, por ejemplo la inhibición, en cierto grado, de la progresión de la enfermedad, incluyendo el enlentecimiento y la detención completa; la reducción del número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; la reducción del tamaño de la lesión; la inhibición (es decir, la reducción, enlentecimiento o detención completa) de la infiltración de células patológicas en órganos y/o tejidos periféricos contiguos; la inhibición (es decir, la reducción, enlentecimiento o detención completa) de la expansión de la enfermedad; la reducción de la respuesta autoinmunitaria, que puede, aunque no necesariamente, resultar en la regresión o ablación de la lesión de la enfermedad; el alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados al trastorno; el incremento de la duración de la presentación sin enfermedad tras el tratamiento, por ejemplo la supervivencia sin progresión; la supervivencia global incrementada; una tasa de respuesta más alta y/o la mortalidad reducida en un punto temporal dado tras el tratamiento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunoensayo" (IE) se refiere a un ensayo de unión específico en el que se detecta un analito mediante la utilización de por lo menos un anticuerpo como pareja de unión o agente específico. Entre los inmunoensayos se incluyen, aunque sin limitación, el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo de fluoroluminiscencia (FLA), el ensayo de quimioluminiscencia (CLA), el ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLA) y el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Los métodos de ELISA se describen en, por ejemplo, el documento nº WO 2001/36972.

La expresión "agente de detección" se refiere a un agente que se une a un analito y es marcado detectablemente. Entre los ejemplos de agentes de detección se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, receptor soluble, fragmento de receptor y similares. La detección de un agente de detección es posible directamente, es decir, mediante un marcaje unido directamente al agente, o indirectamente mediante una segunda pareja de unión marcada, tal como un anticuerpo o receptor adicional que se une específicamente al agente de detección.

El término "marcaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal detectable, visiblemente o mediante la utilización de instrumentación adecuada. Entre los diversos marcajes adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cromógenos, compuestos fluorescentes, quimioluminiscentes o electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, pigmentos, partículas metálicas y no metálicas coloidales y partículas de látex y polímero orgánico.

Un "marcaje directamente detectable" es, por ejemplo, un cromógeno (grupo fluorescente o luminiscente y pigmento), un grupo activo en RMN o una partícula metálica. Los quelatos metálicos que pueden detectarse mediante electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales adecuados, resultando de particular interés los quelatos del rutenio, por ejemplo el quelato (bispiridilo)₃²⁺ de rutenio. se describen grupos de marcaje de rutenio adecuados en, por ejemplo, la patente EP nº 0 580 979 y en los documentos nº WO 90/05301, nº WO 90/11511 y nº WO 92/14138.

El término "luminiscencia" se refiere a cualquier emisión de luz que no derive energía de la temperatura de una fuente energética (por ejemplo una fuente de radiación electromagnética, una reacción química o energía mecánica). En general, la fuente provoca que un electrón de un átomo se desplace de un estado de energía más bajo a un estado de energía más alto "excitado"; entonces el electrón libera esa energía en forma de luz emitida al retornar a un estado de energía más bajo. Dicha emisión de luz habitualmente se produce en el rango visible o próximo al visible del espectro electromagnético. El término "luminiscencia" incluye, aunque sin limitarse a ellos, fenómenos de emisión lumínica tales como la fosforescencia, la fluorescencia, la bioluminiscencia, la radioluminiscencia, la electroluminiscencia, la electroquimioluminiscencia y la termoluminiscencia.

La expresión "marcaje luminiscente" se refiere a un marcaje que genera una señal luminiscente, por ejemplo una emisión de luz que no deriva energía de la temperatura de la fuente emisora. El marcaje luminiscente puede ser, por ejemplo, una molécula fluorescente, una molécula fosforescente, una molécula radioluminiscente, un quelato luminiscente, un compuesto de fósforo o que contiene fósforo, o un punto cuántico.

Un "ensayo de electroquimioluminiscencia" o "ECLA" es un ensayo electroquímico en el que la molécula de analito unida se detecta con un marcaje unido a un agente de detección (molécula diana). Un electrodo inicia electroquímicamente la luminiscencia de un marcaje químico unido a un agente de detección. La luz emitida por el marcaje se mide con un fotodetector e indica la presencia o cantidad de complejos de molécula de analito/molécula diana unidos. Los métodos ECLA se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.543.112, nº 5.935.779 y nº 6.316.607. La modulación de la señal puede maximizarse para diferentes concentraciones de molécula de analito para conseguir mediciones precisas y sensibles.

En un procedimiento de ECLA pueden suspenderse micropartículas en la muestra para la unión eficiente al analito. Por ejemplo, las partículas pueden presentar un diámetro de entre 0,05 µm y 200 µm, de entre 0,1 µm y 100 µm, o de entre 0,5 µm y 10 µm, y un componente de superficie capaz de unirse a una molécula de analito. En un sistema de ECLA utilizado frecuentemente (Elecsys, Roche Diagnostics, Alemania), las micropartículas presentan un diámetro de aproximadamente 3 µm. Las micropartículas pueden estar formadas de almidón entrecruzado, dextrano, celulosa, proteína, polímeros orgánicos, copolímero de estireno, tal como copolímero de estireno/butadieno, copolímero de acrilonitrilo/butadieno/estireno, copolímero de acrilato de vinilacetilo, copolímero de cloruro de vinilo/acrilato, partículas inorgánicas inertes, dióxido de cromo, óxidos de hierro, sílice, mezclas de sílice, materia proteica, o mezclas de los mismos, incluyendo, aunque sin limitación, perlas de sefarosa, perlas de látex, partículas de cubierta-núcleo, y similares. Las micropartículas preferentemente están monodispersadas y pueden ser magnéticas, tales como perlas paramagnéticas. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.628.037, nº 4.965.392, nº 4.695.393, nº 4.698.302 y nº 4.554.088. Las micropartículas pueden utilizarse en una cantidad de entre aproximadamente 1 y 10.000 µg/ml.

Un "límite de detección" para una molécula de analito en un ensayo particular es una concentración mínima de la molécula de analito que puede detectarse, superior a los niveles de fondo para ese ensayo. Por ejemplo, en el IE y el ECLA, el límite de detección para una molécula de analito que se une específicamente a una molécula diana puede ser la concentración a la que la molécula de analito produce una señal IE o una señal de ECLA superior a la producida por un anticuerpo de control que no se une, o que se une no específicamente, al antígeno diana. Las moléculas que presentan una respuesta de IE inferior al límite de detección de IE son IE⁻. Las moléculas que presentan una respuesta de IE igual o superior al límite de detección de IE son IE⁺. Las moléculas que presentan una respuesta de ECLA inferior al límite de detección de ECLA son ECLA⁻. Las moléculas que presentan una respuesta de ECLA igual o superior al límite de detección de ECLA son ECLA⁺. Los límites de detección pueden elevarse o bajarse para conseguir un resultado de ensayo deseado.

Una "fase sólida", también conocida como "soporte sólido", es material polimérico insoluble funcionalizado al que pueden engancharse o unirse covalentemente elementos de biblioteca o reactivos (con frecuencia mediante un conector) para inmovilizarse o dejar que se separen fácilmente (mediante filtración, centrifugación, lavado, etc.) de los reactivos en exceso, los productos secundarios de reacción solubles, o los solventes. Las fases sólidas para los inmunoensayos según la invención se encuentran ampliamente descritos en el estado de la técnica (ver, por

ejemplo, Butler J.E., Methods 22:4-23, 2000). La expresión "fase sólida" se refiere a una sustancia no fluida e incluye partículas (incluyendo micropartículas, perlas, perlas magnéticas y partículas metálicas o no metálicas) preparadas con materiales tales como polímero, metal (partículas ferromagnéticas, paramagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias de gel, tales como los geles de sílice, alúmina y polímero; capilares, que pueden prepararse con polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; membranas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; y cubetas, tubos, chips u otros recipientes de muestra para espectrómetro. Un componente de fase sólida de un ensayo se distingue de las superficies sólidas inertes con las que el ensayo puede encontrarse en contacto en que una "fase sólida" contiene por lo menos una fracción sobre su superficie, que está destinado a interactuar con el anticuerpo de captura o molécula de captura. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta, chip o placa de microtitulación, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como perlas y micropartículas. Las micropartículas también pueden utilizarse como fase sólida para formatos de ensayo homogéneo. Puede utilizarse una diversidad de micropartículas que permiten la unión no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Entre dichas partículas se incluyen partículas de polímero tales como poliestireno y poli(metilmecrilato); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro, y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, vidrio y de óxido metálico. Ver, por ejemplo, Martin C.R. et al., Analytical Chemistry-News & Features 70:322A-327A, 1998, que se incorpora como referencia en la presente memoria.

Los términos "chip", "biochip", "chip de polímero" o "chip de proteína" se utilizan intercambiamente y se refieren a una colección de un gran número de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos dispuestos sobre un sustrato compartido (por ejemplo una fase sólida) que podría ser una parte de una oblea de silicio, una tira de nilón, una tira de plástico o un portaobjetos de vidrio.

La expresión "área de ensayo discreta" según la presente invención se utiliza para contener un único tipo de molécula de captura. Las áreas de ensayo discretas vecinas sobre una fase sólida de componente estacionario, por ejemplo una matriz o un chip, no se solapan entre sí. En el caso de que la fase sólida sea, por ejemplo, una matriz o un chip, las áreas de ensayo discretas pueden ser contiguas entre sí. Además, resulta posible un espaciado entre por lo menos dos "áreas de ensayo discretas" sobre un componente estacionario. Las áreas de ensayo discretas sobre una fase sólida de componente estacionario, por ejemplo una matriz o un chip, pueden organizarse en patrones geométricos. En el caso de que la fase sólida sea un componente no estacionario, tal como perlas y micropartículas, la expresión "área de ensayo discreta" se refiere a que sobre cada componente no estacionario se inmoviliza un tipo de molécula de captura.

Una "matriz", "macromatriz" o "micromatriz" es una colección deliberadamente creada de sustancias, tales como moléculas, marcadores, aberturas, microbobinas, detectores y/o sensores, unidos o fabricados en un sustrato o superficie sólida, tal como vidrio, plástico, chip de silicio u otro material que forma una matriz. Las matrices pueden utilizarse para medir los niveles de gran número, por ejemplo decenas, miles o millones, de reacciones o combinaciones simultáneamente. Una matriz puede contener además un número reducido de sustancias, por ejemplo una, unas cuantas o una docena. Las sustancias en la matriz pueden ser idénticas o diferentes. La matriz puede adoptar una diversidad de formatos, por ejemplo bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de moléculas inmovilizadas, bibliotecas de anticuerpos inmovilizados, bibliotecas de compuestos anclados en perlas de resina, chips de sílice u otras fases sólidas. La matriz puede ser una macromatriz o una micromatriz, según el tamaño de las almohadillas en la matriz. Una macromatriz generalmente contiene tamaños de almohadilla de aproximadamente 300 micrómetros o mayores y puede obtenerse una imagen fácilmente mediante escáners de gel y de filtro. Una micromatriz generalmente contendría tamaños de almohadilla inferiores a 300 micrómetros.

Método:

Se utilizan crecientemente anticuerpos monoclonales terapéuticos (ACmT) para combatir una amplia diversidad de enfermedades. La aplicación de un ACmT al factor de necrosis tumoral (<FNTα>) o CD20 (<CD20>), es de importancia crucial para muchos pacientes con un diagnóstico de enfermedad inflamatoria crónica, tal como la artritis reumatoide (AR). Estos ACmT también se utilizan frecuentemente para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (EC), la espondilitis anquilosante (EA), la artritis idiopática juvenil poliarticular (AIJ), la artritis sorriática (AS), la enfermedad de Bechterew o la soriasis de placas crónica (S), así como otras enfermedades. Varios ACmT utilizados en la terapia de las enfermedades inflamatorias crónicas pertenecen al grupo de los anticuerpos anti-<FNTα>.

Tal como se ha comentado en detalle anteriormente, los ACmT son ACmT quiméricos de ratón-humano (por ejemplo el infliximab) o ACmT humanos (por ejemplo el adalimumab). Los ACmT contienen elementos que pueden ser "foráneos" para el sistema inmunológico del paciente. Dichos AC anti-<ACmT> pueden aparecer durante el tratamiento con dicho ACmT como reacción inmunológica de defensa del paciente (Pan Y. et al., FASEB J. 9:43-49, 1995).

En el caso de que el sistema inmunológico trate un elemento de un ACmT como foráneo, debe esperarse que la administración de esta proteína inducirá una respuesta inmunológica. Los AC anti-<ACmT> pueden dirigirse contra cualquier región del ACmT, tal como la región variable, la región constante o la glucoestructura del ACmT. Las

regiones de dominio variable que comprenden elementos de secuencia raros son dominios que podrían provocar una respuesta inmunológica del sistema inmune de un paciente tratado con un ACmT.

5 Los presentes inventores han desarrollado un método de inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-
<anticuerpo monoclonal terapéutico> (AC anti-<ACmT>) contra un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT).

10 En una realización, la presente invención se refiere a un método de inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo anti-<anticuerpo monoclonal terapéutico> (anti-AC<ACmT>) in vitro en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT), comprendiendo el
15 método: a) proporcionar un fragmento F(ab) de dicho ACmT unido a una fase sólida, b) incubar la fase sólida proporcionada en (a) con la muestra, uniendo de esta manera el AC anti-<ACmT> a la fase sólida mediante el fragmento F(ab), c) incubar la fase sólida obtenida en (b) con un anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h>, en la que dicho anticuerpo monoclonal se une al AC anti-<ACmT>, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgM que presenta un valor de la constante de disociación ($=K_D$) de entre aproximadamente 10^{-6} moles/l y 10^{-8} moles/l, y d) detectar el anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h> unido en (c) y determinar de esta manera el AC anti-<ACmT> en la muestra.

20 El sujeto o paciente puede ser cualquier especie de mamífero. En una realización preferente, el sujeto o paciente es un ser humano. En una realización, se determina un AC anti-<ACmT> humano en el método de inmunoensayo.

25 En una realización, la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de una muestra líquida, tal como anticuerpos recuperados del paciente, sangre completa, plasma o suero. En una realización adicional, la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de sangre completa, plasma o suero, siendo el suero el más preferente. En una realización, la muestra se deriva de un ser humano.

30 El antígeno unido a la fase sólida para la determinación de AC anti-<ACmT> contra un ACmT se selecciona de entre el grupo que consiste de un fragmento Fab' de un ACmT, un fragmento Fab de un ACmT, un scFv que representa un ACmT y un diacuerpo que representa un ACmT. En una realización preferente, el fragmento F(ab) de dicho ACmT se selecciona de entre el grupo que consiste de un fragmento Fab' de dicho ACmT y un fragmento Fab de dicho ACmT. En una realización preferente, el antígeno unido a una fase sólida para la determinación de un AC anti-<ACmT> es un fragmento Fab del ACmT de interés. En una realización preferente, el antígeno unido a una fase sólida para la determinación de un AC anti-<ACmT> es un fragmento Fab' del ACmT de interés.

35 Inesperadamente los inventores han encontrado que un método de inmunoensayo basado en la utilización de un fragmento F(ab) de un ACmT de interés unido a una fase sólida puede superar por lo menos algunas de las limitaciones actuales referentes a la especificidad y sensibilidad de detección de un AC anti-<ACmT> en una muestra de un paciente tratado con dicho ACmT.

40 El antígeno (por ejemplo un fragmento F(ab)) proporcionado en el método de inmunoensayo, en una realización se une a la fase sólida mediante un sistema de unión seleccionado de entre el grupo que consiste de unión covalente, unión directa e interacción de afinidad. Una unión covalente de un antígeno (por ejemplo un fragmento F(ab)) proporcionado en el método de inmunoensayo puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, una activación con epoxi, NHS o carboximetilo de la fase sólida y la posterior reacción con un grupo funcional apropiado del antígeno. Una unión directa de un antígeno (por ejemplo un fragmento F(ab)) proporcionado en el método de inmunoensayo
45 puede basarse en, por ejemplo, interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas, la unión de quelatos o interacciones adsorptivas. Una interacción de afinidad de un antígeno (por ejemplo un fragmento F(ab)) puede basarse en, por ejemplo, interacciones de biotina/estreptavidina, biotina/avidina, etiqueta/anti-etiqueta, lecitina/anticuerpo o biotina/anticuerpo anti-<biotina>.

50 En una realización, el antígeno proporcionado en el método de inmunoensayo se une a la fase sólida mediante un sistema de unión seleccionado de entre el grupo que consiste de biotina/estreptavidina, biotina/avidina y biotina/anticuerpo anti-<biotina>. Para permitir dicha unión, el antígeno se biotinila (por ejemplo el fragmento F(ab)-Bi). En una realización preferente, un fragmento F(ab) proporcionado en el método se une a la fase sólida mediante un sistema de unión seleccionado de entre el grupo que consiste de biotina/estreptavidina y biotina/avidina. En una
55 realización preferente adicional, un fragmento F(ab) proporcionado en el método se une a la fase sólida mediante un sistema de unión seleccionado de entre el grupo que consiste de biotina/estreptavidina y biotina/avidina. En una realización preferente adicional, un fragmento Fab' proporcionado en el método se une a la fase sólida mediante un sistema de unión seleccionado de entre el grupo que consiste de biotina/estreptavidina y biotina/avidina.

60 Los métodos de biotilación son conocidos por el experto en la materia. Una descripción detallada de variantes de reacción y condiciones de reacción para conjugar fragmentos de anticuerpo, así como otras proteínas y biomoléculas, se proporciona en G.T. Hermanson: Bioconjugate Techniques, Elsevier/AP, 2008, 2a edición (ISBN: 978-0-12-370501-3). El método para la producción de un fragmento Fab conjugado con biotina (Fab-Bi) de un ACmT según la presente invención se describe en el Ejemplo 1.

65

La unión del antígeno (por ejemplo el fragmento F(ab)) a la fase sólida puede llevarse a cabo bajo condiciones laterales controladas, de manera que el dominio de unión a antígeno se presente hacia afuera de la superficie de la fase sólida, proporcionando la accesibilidad más alta del antígeno, utilizando (i) la conjugación específica de sitio (por ejemplo una conjugación en la región de bisagra de un fragmento F(ab) o una conjugación asistida por etiqueta, o (ii) una interacción específica de sitio a con la fase sólida (por ejemplo una interacción estéricamente orientada específica de un antígeno con una fase sólida recubierta con lecitina).

En una realización, la región bisagra de un fragmento F(ab) se conjuga con la fase sólida. En una realización, la región bisagra de un fragmento Fab se conjuga con la fase sólida. En una realización, la región bisagra de un fragmento Fab' se conjuga con la fase sólida.

En una realización, un fragmento F(ab) se conjuga con la fase sólida mediante una interacción orientada estéricamente de dicho fragmento F(ab) con una fase sólida recubierta con lecitina. En una realización, un fragmento Fab se conjuga con la fase sólida mediante una interacción orientada estéricamente de dicho fragmento Fab con una fase sólida recubierta con lecitina. En una realización, un fragmento F(ab) se conjuga con la fase sólida mediante una interacción orientada estéricamente de dicho fragmento Fab' con una fase sólida recubierta con lecitina.

Un acoplamiento estocástico no dirigido estéricamente de un fragmento F(ab) a la fase sólida proporciona resultados equivalentes al acoplamiento dirigido estéricamente. Sin embargo, sin deseo de restringirse a dicha teoría, el acoplamiento dirigido puede, bajo algunas circunstancias, resultar ventajoso.

En una realización, el método según la presente invención se pone en práctica con un ACmT de interés seleccionado de entre el grupo que consiste de anticuerpos quiméricos (AQ) y anticuerpos humanizados (AH).

En una realización, el método según la presente invención se pone en práctica con un F(ab) biotinilado (F(ab)-Bi) de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab. En una realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento F(ab)-Bi de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab. En otra realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento F(ab)-Bi de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de infliximab, y adalimumab. En otra realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento F(ab)-Bi del anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) infliximab.

En una realización, el método según la presente invención se pone en práctica con un F(ab) biotinilado (F(ab)-Bi) de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab. En una realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento Fab-Bi de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab. En otra realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento F(ab)-Bi de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de infliximab y adalimumab. En otra realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento F(ab)-Bi del anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) infliximab.

En una realización, el método según la presente invención se pone en práctica con un Fab' biotinilado (Fab'-Bi) de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab. En una realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento Fab'-Bi de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab. En otra realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento Fab'-Bi de un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) seleccionado de entre el grupo que consiste de infliximab y adalimumab. En otra realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con un fragmento Fab'-Bi del anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) infliximab.

Es conocido por el experto en la materia que tras la unión del AC anti-<ACmT> a una fase sólida mediante el fragmento F(ab) formando un complejo AC anti-<ACmT>-F(ab), pueden eliminarse compuestos unidos laxamente no específicos, por ejemplo mediante una etapa de lavado.

El AC anti-ACmT que debe determinarse se une específicamente al fragmento F(ab) del ACmT de interés. En una realización preferente, el anticuerpo de interés es un ACmT anti-FNT α . En otra realización preferente, el anticuerpo de interés se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab. En otra realización preferente, el anticuerpo de interés se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab y adalimumab. En otra realización preferente el anticuerpo de interés es el infliximab. Se forma un complejo "AC anti-ACmT-fragmento F(ab), en caso de hallarse presente AC anti-ACmT en la muestra obtenida de un paciente tratado con un ACmT y se une al fragmento F(a) de dicho ACmT unido a la fase sólida. Tal como resultará evidente para el experto en la materia, el fragmento F(ab) del ACmT y del AC anti-ACmT se incuban bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de AC anti-ACmT-F(ab).

La técnica de ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) es un tipo de ensayo común en la investigación de la respuesta inmunogénica de un paciente a un ACmT. Existen varios formatos de ELISA diferentes conocidos por el experto en la materia, por ejemplo el "ensayo indirecto", el "ensayo de tipo sándwich", el "ensayo competitivo", el "ensayo de puente de doble antígeno (EPDA)" o el "ensayo inverso". Mire-Sluis A.R. et al., J. Immunol. Methods 289:1-16, 2004, resumen las recomendaciones de diseño y optimización de los inmunoensayos utilizados en la detección de anticuerpos del huésped, por ejemplo los AC anti-ACmT frente a los productos biotecnológicos (por ejemplo los ACmT).

En una realización preferente, se lleva a cabo el método según la presente invención en un formato de ensayo indirecto. Inesperadamente, en el formato de ensayo indirecto los fragmentos Fab resultan en una diferenciación mucho mejor entre resultados verdaderamente negativos y positivos, tal como se muestra en los Ejemplos 4 y 5. En dicho formato de ensayo indirecto se utiliza un anticuerpo monoclonal <IgG ag_h> como anticuerpo monoclonal de detección.

El método de inmunoensayo según la presente invención en una realización se pone en práctica con un anticuerpo de detección <IgG-Ag_h> que presenta una baja afinidad para la unión de los anticuerpos específicos de antígeno (AC anti-ACmT). La afinidad de un anticuerpo para un epítipo se define como la intensidad de todas las interacciones no covalentes entre el sitio individual de unión a antígeno en un anticuerpo y el epítipo individual. Los anticuerpos con una baja afinidad se unen débilmente y se disocian rápidamente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen más fuertemente y siguen unidos durante un periodo de tiempo más prolongado. La afinidad en un sitio de unión no siempre refleja la intensidad real de una interacción de antígeno-anticuerpo. Por ejemplo, en el caso de antígenos complejos, con muchos determinantes antigénicos repetidos y con anticuerpos complementarios que presentan varios sitios de unión de baja afinidad, se observa sin embargo una unión bastante unión debido a fenómenos de unión cooperativa. La interacción de un antígeno y un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo en un primer sitio incrementa la probabilidad de una reacción en un segundo sitio de unión a antígeno del mismo anticuerpo. La fuerza de dichas múltiples interacciones entre el anticuerpo multivalente y un antígeno se denomina avidéz. Una avidéz elevada compensa una baja afinidad tal como es el caso, por ejemplo, de la inmunoglobulina pentamérica IgM. En el método según la invención, preferentemente se utiliza un anticuerpo con una baja afinidad para el anticuerpo específico de antígeno, que presenta varios, es decir por lo menos dos, preferentemente por lo menos cuatro y también preferentemente diez y más paratopos, tal como la inmunoglobulina IgM o IgG que se entrecruzan uno con otro. Son ejemplos de lo anterior los factores reumatoides, que habitualmente están compuestos de moléculas de IgM y más raramente también de moléculas de IgG, IgA e IgE.

Un experto en la materia conoce que el valor de la afinidad de una pareja de unión, preferentemente un anticuerpo, se determina a partir del coeficiente de afinidad definido con el modelo de Langmuir. Una molécula con una constante de tasa de disociación ($K_{disoc.}$) elevada es probable que presente una baja afinidad, ya que la constante de equilibrio de disociación $K_D = K_{disoc.}/K_{asoc.}$ Predice que el coeficiente de afinidad para una afinidad de unión muy elevada es de entre aproximadamente 10^{-9} y 10^{-11} , para una afinidad de unión intermedia, de aproximadamente 10^{-8} , para una afinidad de unión baja, de aproximadamente 10^{-7} y para una afinidad de unión muy baja, de aproximadamente 10^{-6} . El anticuerpo monoclonal de detección <Ag_h-IgG> de la presente invención presenta una afinidad de unión baja. En una realización, el anticuerpo monoclonal de detección <IgG ag_h> utilizado en el inmunoensayo de la presente invención es un anticuerpo que presenta un valor de K_D de entre aproximadamente 10^{-6} moles/l y 10^{-8} moles/l. En una realización preferente, el anticuerpo monoclonal de detección <IgG ag_h> es un anticuerpo con un valor de K_D de entre aproximadamente 10^{-7} moles/l y 10^{-8} moles/l.

Tal como se ha comentado anteriormente, la determinación del AC anti-ACmT en la muestra unida en la etapa (c) del método de inmunoensayo dado a conocer en la presente invención se lleva a cabo con un anticuerpo monoclonal de detección <IgG ag_h>. En una realización, dicho anticuerpo monoclonal de detección es de la clase de inmunoglobulina IgM. Preferentemente el anticuerpo monoclonal <IgG ag_h> se une a anticuerpos de la clase de inmunoglobulina IgG que se unen a su antígeno de una manera específica. Dicho anticuerpo monoclonal sólo reconoce los AC anti-ACmT densamente empaquetados y unidos específicamente, es decir, aquellos AC anti-ACmT que se han unido a los fragmentos F(ab) de los ACmT de interés aplicados en puntos sobre la fase sólida. Dicho anticuerpo de detección no reacciona con los IgG unidos o adsorbidos no específicamente.

En una realización, el método según la presente invención se pone en práctica utilizando un anticuerpo monoclonal marcado <IgG ag_h>. En una realización preferente, el anticuerpo monoclonal <IgG ag_h> se marca con Dig (<IgG

ag_h>Dig). El anticuerpo monoclonal marcado con Dig <IgG ag_h>-Dig se detecta fácilmente con un anticuerpo anti-
<Dig> conjugado con un marcaje detectable. Dicho marcaje detectable, por ejemplo, puede seleccionarse de entre
marcajes luminiscentes, marcajes quimioluminiscentes, marcajes electroquimioluminiscentes, marcajes
fluorescentes o marcajes radioactivos.

El anticuerpo monoclonal <IgG ag_h> utilizado en el método según la presente invención en una realización es
específico para la clase de Ig seleccionada que debe determinarse. En una realización preferente, el anticuerpo
monoclonal <IgG ag_h> utilizado en el método según la presente invención es específico para la clase IgG. En una
realización, el anticuerpo monoclonal <IgG ag_h> es capaz de detectar todas las subclases de IgG.

Inesperadamente los inventores pudieron demostrar que la utilización de un anticuerpo monoclonal de detección
<IgG ag_h> en un método de inmunoensayo tal como se da a conocer en la presente invención conduce a una
detección mejorada del AC anti-<ACmT> en una muestra y supera por lo menos algunas de las limitaciones actuales
en la detección precoz de los AC anti-<ACmT>. Inesperadamente, la combinación de un fragmento F(ab) del ACmT
de interés aplicado en un punto sobre la fase sólida con el anticuerpo de detección <IgG ag_h> en un formato de
inmunoensayo indirecto ha permitido a los inventores la detección muy precoz de AC anti-<ACmT> de la clase IgG
de dicho ACmT. Resulta posible detectar el AC anti-<ACmT> de la clase IgG in vitro en una muestra de un paciente
tratado con un ACmT desde las 2 semanas posteriores a la primera administración de dicho ACmT. En una
realización preferente, la combinación de un fragmento Fab del ACmT de interés aplicado en un punto sobre la fase
sólida con el anticuerpo de detección <IgG ag_h> en un formato de inmunoensayo indirecto ha permitido la
detección de AC anti-<ACmT> de la clase IgG de dicho ACmT desde las 2 semanas posteriores a la primera
administración de dicho ACmT. En una realización también preferente, la combinación de un fragmento Fab' del
ACmT de interés aplicado en un punto sobre la fase sólida con el anticuerpo de detección <IgG ag_h> en un formato
de inmunoensayo indirecto ha permitido la detección de AC anti-<ACmT> de la clase IgG de dicho ACmT desde las
2 semanas posteriores a la primera administración de dicho ACmT.

En una realización, el anticuerpo monoclonal <IgG ag_h> utilizado en el método según la presente invención se
selecciona de entre el grupo que consiste de MAb <IgG ag_h>M-3.022.5-IgM (DSM ACC2873), MAb <IgG ag_h>M-
1.010.2-IgM y MAb <IgG ag_h>M-1.1.7-IgM (mostrado en la Tabla 1). En una realización preferente, el anticuerpo
monoclonal de detección <IgG ag_h> es el MAb <IgG ag_h>M3.022.5-IgM-Dig (DSM nº ACC2873). Un elemento
característico del MAb <IgG ag_h>M3.022.5-IgM-Dig es que las inmunoglobulinas unidas no específicamente a la
fase sólida, es decir, aquellas que no son específicamente ligadas por un antígeno, no resultan reconocidas o sólo
resultan reconocidas en un grado despreciable. Sin deseo de restringirse a dicha teoría, la utilización de MAb <IgG
ag_h>M3.022.5-IgM-Dig podría reducir sustancialmente la señal de fondo en el inmunoensayo y de esta manera
mantenerlo a un nivel bajo constante independientemente de las IgG posiblemente interfirientes en una muestra que
debe analizarse.

El método de inmunoensayo según la presente invención en una realización se lleva a cabo en un formato de matriz,
por ejemplo sobre un chip o biochip. En dicho formato de matriz, el fragmento o fragmentos F(ab) de uno o más
ACmT se inmovilizan sobre áreas discretas de la fase sólida, las cuales se definen como áreas de ensayo que se
encuentran espacialmente separadas entre sí. Los métodos para inmovilizar las parejas de unión de captura (por
ejemplo el fragmento o fragmentos F(ab)) resultarán familiares al experto en la materia y se dan a conocer, por
ejemplo, en la patente EP nº 0 929 319 (Hornauer et al.).

Las áreas de ensayo que comprenden uno o más puntos que contienen la misma pareja de unión de captura pueden
encontrarse presentes sobre la fase sólida. En una realización, pueden formarse patrones que consisten de varios
puntos idénticos.

Resulta ventajoso de dicho inmunoensayo en formato de matriz (por ejemplo sobre un chip o biochip) que puedan
determinarse simultáneamente diferentes analitos. En una realización, cada uno de diversas áreas o puntos
discretos en un formato de matriz contiene fragmentos F(ab) de uno de los diferentes ACmT de interés que son
capaces de unirse específicamente a un AC anti-<ACmT> que debe determinarse. En una realización, dicha matriz
comprende por lo menos dos áreas discretas, en la que en cada área se encuentra presente un fragmento F(ab)
diferente de un ACmT de interés. También resulta posible disponer de una combinación de fragmentos F(ab)
derivados de diferentes ACmT de interés y varios puntos, conteniendo cada uno el fragmento F(ab) de uno de
dichos ACmT diferentes, respectivamente, sobre una matriz. En una realización, se encuentran presentes sobre
dicha matriz por lo menos dos fragmentos F(ab) diferentes derivados de los ACmT de interés, presentando cada uno
dos o más puntos individuales. En una realización, la matriz utilizada en el método preferentemente consiste de un
soporte realizado en metal, vidrio, plástico o poliestireno. Los soportes de poliestireno preferentemente se utilizan en
el método según la invención, los cuales son conocidos por el experto en la materia y se describen en, por ejemplo,
la patente EP nº 0939319 (Hornauer et al.). La utilización del anticuerpo <IgG ag_h>M3.022.5-IgM-Dig en dicho
método realizado en un formato de matriz permite que puedan combinarse sobre una matriz entre varios y un gran
número de diferentes ensayos para AC anti-<ACmT> de interés. Una ventaja importante de un formato de ensayo de
matriz es que sólo se requiere una composición tamponadora en cada etapa de manipulación.

En una realización, el método según la presente invención se lleva a cabo utilizando una muestra proporcionada por un paciente no más tarde de 14 semanas después de la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti-ACmT se realiza a partir de las 2 semanas posteriores a la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti-ACmT se realiza entre las semanas 2 y 6 posteriores a la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti-ACmT se realiza a partir de las 6 semanas posteriores a la primera administración de un ACmT.

Los métodos según la presente invención también resultan valiosos para la selección de una terapia de ACmT apropiada.

La falta de efectividad (FE) de una terapia de ACmT es un fenómeno raro pero conocido en pacientes bajo tratamiento con un ACmT, por ejemplo para los pacientes bajo tratamiento con un anticuerpo anti-FNT α . La determinación de AC anti-ACmT en un paciente bajo tratamiento con un ACmT se ha utilizado en un intento de predecir la FE de una terapia de ACmT. Se ha demostrado en la técnica anterior que los AC anti-ACmT pueden reducir la cantidad eficaz de ACmT disponible en la circulación del paciente bajo tratamiento con dichos ACmT. Actualmente no está claro qué determina la magnitud de la respuesta de AC anti-ACmT en un paciente tratado con dicho ACmT (Aarden L. et al., Current Opinion in Immunology 20:431-435, 2008). En algunos enfoques terapéuticos, la dosis de dicho ACmT se ha elevado tras un diagnóstico de FE para compensar el ACmT disponible en la circulación del paciente, abriendo algunas preguntas científica y clínicamente relevantes. La determinación del nivel sérico de ACmT actualmente es el estándar de oro en el seguimiento de la eficacia del tratamiento con una terapia de ACmT. Aarden et al. han propuesto que debería realizarse un seguimiento frecuente de los pacientes para los niveles séricos de ACmT y que el nivel de los anticuerpos podría guiar en la decisión de si incrementar la dosis o cambiar a otro ACmT/fármaco.

También se conocen de la técnica anterior efectos secundarios (efectos adversos, RFA) durante la terapia de ACmT, por ejemplo durante la terapia anti-FNT α . Es conocido por el experto en la materia que los pacientes bajo terapia de ACmT están en riesgo de desarrollar una RFA. Sin embargo, aparentemente no se dispone de ningún método para evaluar dicho riesgo pronto después del inicio de una terapia basada en ACmT, por ejemplo antes de que se produzcan RFA.

Inesperadamente se ha encontrado que una determinación in vitro de anticuerpos contra un ACmT de interés en una muestra de un paciente bajo tratamiento con dicho ACmT permite predecir qué pacientes están en riesgo incrementado de desarrollar una RFA durante el tratamiento con un ACmT antes de que se produzca una RFA.

En una realización adicional, se utiliza una determinación in vitro de los anticuerpos contra un ACmT en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente bajo tratamiento con dicho ACmT para identificar los pacientes en riesgo de desarrollar una RFA durante el tratamiento con un ACmT, en el que el paciente positivo para un AC anti-ACmT se encuentra en riesgo de desarrollar una RFA. Sin deseo de restringirse a dicha teoría, bien podría ser el caso de que en un paciente con resultado positivo en el ensayo para AC anti-ACmT contra un ACmT determinado tratado con una dosis más elevada de dicho ACmT, el riesgo de desarrollar posteriormente una RFA sea mucho más alto. Por lo tanto, debe considerarse seriamente un cambio de terapia tras la determinación de un AC anti-ACmT contra el primer ACmT administrado a otro (segundo) ACmT con el fin de reducir el riesgo de una RFA posteriormente.

En una realización, se utiliza el método de la presente invención para determinar si un paciente está en riesgo de desarrollar una RFA durante el tratamiento con un ACmT. En dicha realización, un paciente con un resultado positivo en el ensayo para AC anti-ACmT se encuentra en riesgo de desarrollar una RFA. Un paciente con un resultado positivo para AC anti-ACmT en el método dado a conocer en la presente memoria presenta un riesgo incrementado de desarrollar una RFA. Dicho riesgo puede determinarse como un riesgo relativo utilizando métodos matemáticos conocidos por el experto en la materia. Tal como se muestra en los ejemplos, el desarrollo temprano de AC anti-ACmT precede al posterior desarrollo de una RFA y/o el abandono de los pacientes del estudio. En una realización, el riesgo de desarrollar una RFA es un riesgo relativo de por lo menos 40%; en una realización preferente, el riesgo es un riesgo relativo de por lo menos 45%.

Las gráficas de serie temporal de AC anti-ACmT de las figs. 2 y 3 muestran la diferencia entre pacientes que no han abandonado y aquellos que se han retirado del estudio debido a una RFA. Los datos de estudio del Ejemplo 5 se representan en la fig. 2, mostrando los resultados para pacientes tratados con infliximab en forma de curvas de Kaplan-Meier (KM) con respecto al estatus de AC anti-ACmT en la semana 6. En la fig. 3, los resultados de los pacientes tratados con infliximab como curvas de KM con respecto al estatus de anti-ACmT en la semana 14. En ambas figuras para pacientes que han abandonado debido a una RFA (o para pacientes que han abandonado debido a la falta de efecto del tratamiento) las curvas de KM de los pacientes positivos para AC anti-ACmT (AC anti-ACmT+) son más bajas que las curvas de KM de los pacientes negativos para AC anti-ACmT (AC anti-ACmT-). Esta diferencia es incluso más visible en la semana 6 que en la semana 14.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para seleccionar un anticuerpo terapéutico alternativo para un paciente bajo tratamiento con un primer ACmT, en el que se encuentra disponible por lo menos

un primer y uno o más ACmT alternativos, que comprende: a) determinar según un método de inmunoensayo de la presente invención in vitro un AC anti- \langle ACmT \rangle contra el primer ACmT en una muestra procedente de un paciente tratado con dicho primer ACmT, y b) seleccionar un ACmT alternativo para la terapia futura, en caso de que se encuentre presente un AC anti- \langle ACmT \rangle contra dicho primer ACmT.

5 En una realización, el método para seleccionar un anticuerpo terapéutico alternativo se pone en práctica utilizando una muestra obtenida de un paciente que presenta un diagnóstico de enfermedad inflamatoria crónica. En una realización, la enfermedad inflamatoria crónica se selecciona de entre el grupo que consiste de artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn (EC), espondilitis anquilosante (EA), artritis idiopática juvenil poliarticular (AIJ), artritis
10 sorriática (AS), enfermedad de Bechterew y/o soriasis de placas crónica (S). En una realización preferente el paciente presenta un diagnóstico de artritis reumatoide (AR).

En una realización, el método para seleccionar un anticuerpo terapéutico alternativo se pone en práctica utilizando una muestra obtenida de un paciente humano. En una realización, el AC anti- \langle ACmT \rangle determinado es un AC anti- \langle FNT α \rangle .

En una realización, la presente invención se refiere a un método para seleccionar un ACmT alternativo para un paciente bajo tratamiento con un primer ACmT, en el que se encuentra disponible por lo menos un primer y uno o más ACmT alternativos, que comprende: a) determinar in vitro un AC anti- \langle ACmT \rangle de la clase IgG contra el primer
20 ACmT en una muestra procedente de un paciente tratado con dicho primer ACmT, y b) seleccionar un ACmT alternativo para la terapia futura, en caso de que se encuentre presente un AC anti- \langle ACmT \rangle contra dicho primer ACmT.

En una realización, el método para seleccionar un anticuerpo terapéutico alternativo se lleva a cabo utilizando una muestra proporcionada por un paciente no más tarde de 14 semanas después de la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti- \langle ACmT \rangle se realiza a partir de las 2 semanas posteriores a la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti- \langle ACmT \rangle se realiza entre las
25 semanas 2 y 6 posteriores a la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti- \langle ACmT \rangle se realiza a partir de las 6 semanas posteriores a la primera administración de un ACmT.

Es conocido por el experto en la materia cómo seleccionar un ACmT alternativo para la terapia futura, en el caso de que se halle presente un AC anti- \langle ACmT \rangle contra dicho primer ACmT en una muestra obtenida de un paciente bajo tratamiento con dicho primer ACmT. En una realización, el ACmT alternativo se selecciona de entre el grupo que
30 consiste de un anticuerpo monoclonal anti- \langle FNT α \rangle y rituximab. En una realización, el ACmT alternativo se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab. En una realización, el ACmT alternativo es un anticuerpo monoclonal anti- \langle FNT α \rangle . En una realización, el ACmT alternativo es un anticuerpo anti- \langle CD20 \rangle . En una realización, el ACmT alternativo es el rituximab. En una realización, el primer ACmT es un anticuerpo monoclonal anti- \langle FNT α \rangle y el ACmT alternativo es un anticuerpo anti- \langle CD20 \rangle . En una realización, el primer ACmT es un anticuerpo monoclonal anti- \langle FNT α \rangle y el ACmT alternativo es el rituximab.

Utilización:

El método según la presente invención puede utilizarse generalmente para la detección de los AC anti- \langle ACmT \rangle , tanto en ensayo clínico como también en la rutina clínica. En una realización, la presente invención se refiere a la
45 utilización del método de inmunoensayo de la presente invención para la detección de los AC anti- \langle ACmT \rangle .

En una realización, la presente invención se refiere a la utilización del método de inmunoensayo tal como se da a conocer en la presente memoria para la identificación de un paciente en riesgo de desarrollar una reacción farmacológica adversa (RFA) mediante la determinación de un AC anti- \langle ACmT \rangle in vitro en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT).

En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de un método de inmunoensayo para la determinación de un AC anti- \langle ACmT \rangle in vitro, en el que se detecta el AC anti- \langle ACmT \rangle utilizando una muestra de sangre completa, plasma o suero obtenida de un paciente no más tarde de las 14 semanas después de la primera
55 administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti- \langle ACmT \rangle se realiza a partir de las 2 semanas posteriores a la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti- \langle ACmT \rangle se realiza entre las semanas 2 y 6 posteriores a la primera administración de un ACmT. En una realización, la detección de AC anti- \langle ACmT \rangle se realiza no más tarde de las 6 semanas después de la primera administración de un ACmT.

El método según la presente invención puede utilizarse para el seguimiento de los pacientes tratados con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT) que están en riesgo de desarrollar una RFA. El método se utiliza en una realización para investigar la frecuencia de desarrollo de AC anti- \langle ACmT \rangle en pacientes durante el tratamiento con ACmT y para determinar si el desarrollo de dichos AC anti- \langle ACmT \rangle se asocia a una RFA temprana y/o al fracaso
65 del tratamiento.

Los ejemplos y la figura siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

5 Descripción de las figuras

- Figura 1 La fig. 1 muestra el formato de inmunoensayo indirecto tal como se indica en el Ejemplo 3. AC anti-ACmT = anticuerpo anti-anticuerpo monoclonal terapéutico que debe detectarse en una muestra que debe investigarse; MAb <IgG ag_h>; Dig = anticuerpo monoclonal marcado con Dig <IgG ag_h>; F(ab')₂-Bi y Fab-Bi = sobre fase sólida, antígenos biotinilados inmovilizados de unión específica a AC anti-ACmT.
- Figura 2 La fig. 2 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes tratados con infliximab que abandonaron el estudio debido a RFA ≤ 50 semanas. Eje X = abandono del estudio en días (ab_días); eje Y = función de distribución de la supervivencia; línea inferior = pacientes con anticuerpos antifármaco detectados (AC anti-ACmT+) en la semana 6: total = 31, fracaso = 15; línea superior = pacientes sin anticuerpos antifármacos detectados (AC anti-ACmT-) en la semana 6: total = 94, fracaso = 12; valor de p de la prueba de rangos logarítmicos ≤ 0,0001; cociente de riesgos=5,06, IC al 95% cociente de riesgos = [2,36, 10,84]. Se muestran los datos en la Tabla 4.
- Figura 3 La fig. 3 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes tratados con infliximab que abandonaron el estudio debido a RFA ≤ 50 semanas. Eje X = abandono del estudio en días (ab_días); eje Y = función de distribución de la supervivencia; línea inferior = pacientes con anticuerpos antifármaco detectados (AC anti-ACmT+) en la semana 14: total = 43, fracaso = 16; línea superior = pacientes sin anticuerpos antifármaco detectados (AAF) en la semana 14: total = 88, fracaso = 12; valor de p de la prueba de rangos logarítmicos ≤ 0,0009; cociente de riesgos=3,30, IC al 95% cociente de riesgos = [1,56, 6,99]. Se muestran los datos en la Tabla 4.
- Figura 4 La fig. 4 muestra un formato de inmunoensayo de tipo sándwich tal como se menciona en la descripción. AC anti-ACmT = anticuerpo anti-anticuerpo monoclonal terapéutico que debe detectarse en una muestra que debe investigarse; F(ab')₂-Dig = fragmento F(ab')₂ marcado con Dig; F(ab')₂-Bi o Fab-Bi = sobre fase sólida, antígenos biotinilados inmovilizados de unión específica a AC anti-ACmT.
- Figura 5a La fig. 5a muestra los resultados de fragmentos de infliximab F(ab')₂-Bi como anticuerpo de captura. VN = muestras de suero obtenidas de donantes de sangre humanos aparentemente sanos (verdaderos negativos). VP = muestras de suero obtenidas de pacientes con AR tratados con infliximab (verdaderos positivos). La altura de las columnas de 50, 500 y 150.000 ha sido truncada.
- Figura 5b La fig. 5b muestra los resultados de fragmentos de infliximab Fab-Bi como anticuerpo de captura. TN = muestras de suero obtenidas de donantes de sangre humanos aparentemente sanos (verdaderos negativos). VP = muestras de suero obtenidas de pacientes con AR tratados con infliximab (verdaderos positivos). La altura de las columnas de 50, 75000, 100.000 y 150.000 ha sido truncada.

Ejemplo 1

Preparación de fragmentos Fab y F(ab')₂ conjugados con biotina del anticuerpo monoclonal terapéutico específico.

Fragmento Fab: El anticuerpo monoclonal terapéutico de longitud completa de la inmunoglobulina de clase G (IgG) en fosfato 100 mM, tampón de EDTA 2 mM, pH 7,0, se incubó con papaína en presencia de cisteína 10-20 mM (5 a 20 mU de papaína por mg de IgG). Se analizó la fragmentación mediante cromatografía analítica de permeación en gel y se detuvo tras 60 a 120 minutos mediante la adición de solución de yodoacetamida (10 mM).

Fragmento F(ab')₂: El anticuerpo terapéutico de longitud completa de la clase de inmunoglobulina G (IgG) en tampón de citrato sódico 100 mM, pH 3,7, se incubó con pepsina (1 a 15 mg de pepsina por mg de IgG). Se analizó la fragmentación mediante cromatografía analítica de permeación en gel y se detuvo tras 90 minutos mediante ajuste del valor del pH a 6,5 mediante la adición de fosfato potásico.

Purificación: ambas mezclas de fragmentación se dializaron, cada una frente a tampón de fosfato sódico 10 mM con cloruro sódico 10 mM, pH 5,5; la solución se aplicó en una columna de cromatografía de SP-sefarosa; las fracciones aisladas eluidas en un gradiente salino se analizaron individualmente mediante filtración analítica en gel. El pool que contenía los fragmentos de anticuerpo Fab o F(ab')₂ se aplicaron a una matriz de afinidad con anticuerpos policlonales inmovilizados frente a Fcg humano para eliminar las cantidades traza de fragmentos Fcg, se agrupó el eluido y se analizó hasta un contenido residual de Fcg. Se repitió por lo menos tres veces el procedimiento de purificación por afinidad hasta que la concentración de Fcg residual cayó a menos de 0,5 ppm. Se concentró el producto a aproximadamente 10 mg/ml y finalmente se aplicó a una columna de filtración en gel (Superdex 200).

Conjugación: los fragmentos purificados libres de Fcg se conjugaron utilizando marcajes de biotina activados con NHS a un valor de pH de entre 8,2 y 8,4. La estequiometría de reacción era 1:5 (IgG:marcaje); se detuvo la reacción mediante la adición de solución de lisina 1 M tras 1 hora y los conjugados en bruto se purificaron en una columna de filtración en gel (Superdex 200).

5 Preparación de fragmento Fab conjugado con biotina del anticuerpo terapéutico específico:
se incubó el fragmento F(ab')₂ purificado con cisteamina 5 mM durante 1 hora; se realizó un seguimiento de la reducción a un fragmento A mediante cromatografía analítica de permeación en gel. El producto en bruto se aplicó en una columna de filtración en gel (Superdex 200) y las fracciones Fab agrupadas se conjugaron inmediatamente con marcajes de biotina activados con MEA (estequiometría 1:10, 1 hora). La primera caracterización analítica se llevó a cabo mediante EM-IEP con el fin de confirmar el sitio de conjugación y el rendimiento.

15 Ejemplo 2

Producción de anticuerpos IgM monoclonales de ratón con especificidad de tipo factor reumatoide

Inmunógeno: polímero H-IgG:

20 Se disolvieron 10 mg de IgG1 humana (Sigma Company) en 0,6 ml de tampón bicarbonato 25 mM, pH 9,5. Tras añadir 3,5 µl de solución de glutaraldehído al 12,5%, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se enfrió en un baño de hielo, se ajustó el pH a 8,3 con solución de trietanolamina 50 mM, pH 8,0 y se añadieron 0,15 ml de solución recién preparada de borohidruro sódico (8 mg de hidruro de boro/ml de agua). Tras 2,5 horas a 0°C, se dializó la preparación durante 16 horas a 4°C frente a tampón de fosfato potásico 10 mM/NaCl 0,2 M, pH 7,5. Se almacenó el dializado que contenía el polímero de IgG en alícuotas a -80°C o se utilizó para la inmunización y para los ensayos de especificidad en sobrenadantes de cultivo de células de hibridoma.

Se produjo el polímero H-IgG3 de manera similar, partiendo de IgG3 humana (Sigma Company).

30 Inmunización de ratones:

En primer lugar se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones Balb/c hembra de 12 semanas de edad, con 100 µg de polímero H-IgG1 o IgG3 conjuntamente con el adyuvante ACF (adyuvante completo de Freund). Tras 8 días se llevó a cabo una inmunización adicional con 100 µg del polímero de IgG respectivo en ACF. Trece días después de la inmunización inicial se administraron por vía intraperitoneal 200 µg del polímero respectivo, sin adyuvante, 14 y 15 días después de la inmunización inicial se administraron 100 µg en cada caso por vías intraperitoneal e intravenosa. Se llevó a cabo la fusión tras 16 días.

40 Producción de clones de hibridoma:

Fusión y clonación:

45 Se fusionaron células de bazo de un ratón inmunizado con células de mieloma siguiendo el método de Galfré G., Methods in Enzymology 73:3-46, 1981. Se mezclaron aproximadamente 1×10^8 células de bazo del ratón inmunización con 2×10^7 células de mieloma (P3X63-Ag8-653, ATCC n° CRL 1580) y se centrifugaron (10 min. a 300g y a 4°C). A continuación, las células se lavaron una vez con medio RPMI-1640 sin suero de feto bovino (SFB) y se centrifugaron nuevamente a 400g en un tubo cónico de 50 ml. Se añadió 1 ml de PEG (polietilenglicol) peso molecular: 4.000, Merck, Darmstadt) y se mezcló mediante pipeteado. Tras 1 min. en un baño de agua a 37°C, se añadieron gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin SFB, se mezclaron, se enrasaron a 50 ml con medio (RPMI 1640 + SFB al 10%) y seguidamente se centrifugaron. Las células sedimentadas se introdujeron en medio RPMI 1640 que contenía SFB al 10% y se sembraron en medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmoles/l de hipoxantina, 1 mg/ml de azaserina en RPMI 1640 + SFB al 10%). Se añadió interleuquina-6 (100 U/ml) al medio a modo de factor de crecimiento. Tras aproximadamente 10 días, se sometieron a ensayo los cultivos primarios para la síntesis de anticuerpos específicos. Se clonaron cultivos primarios que mostraban una reacción positiva con IgG1 humana agregada pero ninguna reacción cruzada con IgG monomérica, utilizando un separador celular activado por fluorescencia en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se añadió interleuquina-6 (100 U/ml) al medio a modo de factor de crecimiento.

60 Se obtuvieron de esta manera los clones de hibridoma siguientes:

Tabla 1:

Nombre de anticuerpo monoclonal	Inmunógeno	Especificidad de subclase
MAB <lgG ag_h>M-3.022.5-IgM	polímero de IgG1_h	IgG 1>IgG3>IgG4>IgG2
MAB <lgG ag_h>M-1.010.2-IgM	polímero de IgG1_h	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
MAB <lgG ag_h>M-1.1.7-IgM	polímero de IgG3_h	IgG1>IgG3>IgG2>IgG4

Ensayo de cribado para anticuerpos monoclonales con especificidad para IgG humana agregada.

- 5 Se recubrieron PMT recubiertas con estreptavidina con IgG1 o IgG3 humana biotinilada. Después se incubaron con el anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo celular. A continuación se detectaron los anticuerpos unidos de la manera habitual utilizando anti-<IgM de ratón>-POD mediante reacción con un sustrato de POD. Determinación de la especificidad de subclase utilizando IgG humana unida a una fase sólida:

- 10 Con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo de las células de hibridoma, las PMT recubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat Company, nº de pedido 12-K 96 N) se recubrieron con 1 µg/ml de IgG_h biotinilada (=IgG_h-Bi) de subclase 1, 2, 3 o 4 en tampón de incubación. Debido a que la IgG unida mediante la biotina a una fase sólida se comporta con IgG polimérica agregada, este enfoque experimental puede utilizarse para determinar la especificidad de subclase. Para ello, se incubaron 100 µl de solución de IgG_h-Bi durante 60 minutos a temperatura ambiente bajo agitación y se lavaron seguidamente 3 veces con NaCl al 0,9%/Tween@-20 al 0,05%.

- 20 En la siguiente etapa se añadieron 100 µl de la solución de anticuerpo que debía examinarse (sobrenadante de cultivo) a un pocillo recubierto y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Tras lavar 3 veces con cloruro sódico al 0,9%/Tween@-20 al 0,05%, se añadieron 100 µl de un fragmento Fab marcado con POD de un anticuerpo policlonal de cabra contra IgM de ratón (Dianova Company, nº de pedido 115-036-075, concentración utilizada: 0,16 µg/ml de tampón de incubación) en cada caso para detectar el anticuerpo unido de la muestra, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación y seguidamente se lavó 3 veces con cloruro sódico al 0,9%/Tween@-20 al 0,05%.

- 25 Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, nº de pedido 1684 302) y se midió la absorbancia a 405/492 nm tras 30 min. a temperatura ambiente en un lector de microplacas MR700 de Dynatech Company.

- 30 Tampón de incubación:

Fosfato de Na 40 mM, pH 7,4, tartrato de Na 200 mM, Tween@-20 al 0,1%, albúmina de suero bovino al 0,2%.

- 35 Determinación de la reactividad/reacción cruzada con IgG1 humana monomérica:

- 40 Con el fin de determinar la reactividad/reacción cruzada con H-IgG1 no agregada monomérica, el anticuerpo monoclonal que debía examinarse se preincubó en el ensayo indicado anteriormente con IgG1 no agregada monomérica a concentraciones crecientes o en exceso. En el caso de que la señal medida no experimentase cambios a un nivel elevado, se concluía que no se había producido reacción cruzada. En el caso de que la señal medida decreciese, se concluía que se había producido una reacción cruzada.

- 45 Para dichas placas de microtitulación (PMT) (MicroCoat Company, nº de pedido 12-K 96 N) recubiertas con estreptavidina recombinante se utilizó un recubrimiento de 1 µg/ml de H-IgG1 biotinilada (=H-IgG1-Bi) en tampón de incubación. Se utilizaron 100 µl de solución de H-IgG1-Bi en cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente bajo agitación y se lavaron seguidamente 3 veces con NaCl al 0,9%/Tween@-20 al 0,05%.

- 50 El anticuerpo monoclonal que debía someterse a ensayo para la reacción cruzada se preincubó con concentraciones en serie de hasta 1 µg/ml de IgG1 no agregada monomérica. Tuvo lugar la preincubación en PMT de 96 pocillos no recubiertas durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación.

- 55 En la siguiente etapa se añadieron 100 µl de dicha solución (anticuerpo + IgG1 monomérica no agregada en exceso) a un pocillo recubierto y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Tras lavar 3 veces con cloruro sódico al 0,9%/Tween@-20 al 0,05%, se añadieron 100 µl de un fragmento Fab marcado con POD de un anticuerpo policlonal de cabra contra IgM de ratón (Dianova Company, nº de pedido 115-036-075, concentración utilizada: 0,16 µg/ml de tampón de incubación) en cada caso para detectar el anticuerpo unido de la muestra, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación y seguidamente se lavó 3 veces con cloruro sódico al 0,9%/Tween@-20 al 0,05%.

- 60 Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, nº de pedido 1684 302) y se midió la absorbancia a 405/492 nm tras 30 min. a temperatura ambiente en un lector de microplacas MR700 de Dynatech Company.

Los anticuerpos monoclonales de unión a factor reumatoide que resultan adecuados en el sentido de la invención reconocen todas las subclases de IgG humana y muestran una reacción cruzada inferior a 10% con IgG_h monomérica en un ensayo de competición. En el caso de que se utilice polímero de H-IgG1 para determinar la reactividad, se reduce en gran medida la señal medida. La Tabla 1 muestra las propiedades principales de los anticuerpos monoclonales que se encontraron.

Fermentación de clones de hibridoma para aislar anticuerpos monoclonales:

Se sembraron las células de hibridoma a una densidad de 1×10^5 células por ml en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 10% y se propagaron durante 7 días en un fermentador (Thermodux Company, Wertheim/Main, modelo MCS-104XL, nº de pedido 144-050). Se alcanzaron concentraciones medias de 100 mg de anticuerpo monoclonal por ml en el sobrenadante de cultivo.

Aislamiento de MAb monoclonal <IgG ag._h>M-3.022.5-IgM:

Se ajustaron 5 mg de MAb <IgG ag._h>M-3.022.5-IgM (DSM nº ACC2873) a un volumen total de 2 ml con tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 8,6. Se añadieron 50 µl de una solución 1,11 mM de N-hidroxisuccinimida-éster de ácido digoxigenín-3-O-metil-carbonil-ε-aminocaproico en dimetilsulfóxido a dicha solución y posteriormente se agitó durante 60 min. a 25°C. La proporción de IgM a digoxigenina activada era de 1:10. La IgM-digoxigenina que se formaba se dializó frente a tampón de fosfato potásico 20 mM/NaCl 0,1 M/sacarosa al 3%, pH 7,5. La IgM-Dig dializada se almacenó en alícuotas a -80°C.

Ejemplo 3

Ensayo ELISA totalmente automatizado en una plataforma de biochip multiparámetro

Se describe una plataforma de biochip multiparámetro en Hornauer H. et al., BIOSpectrum, Special Proteomics 10:564-565, 2004, y Hornauer H. et al., Laborwelt 4:38-39, 2004.

Se aplicó un recubrimiento de estreptavidina sobre el área completa de un área de ensayo de aproximadamente 2,5 x 6 mm en un soporte de poliestireno teñido de negro (fase sólida). Se aplicaron en el área de ensayo líneas de puntos idénticos, aproximadamente 10 a 20 por línea, consistentes de fragmentos biotinilados del anticuerpo terapéutico, utilizando un procedimiento de chorro de tinta; el diámetro por punto era de aproximadamente 150 µm.

Se utilizaron los reactivos específicos de ensayo siguientes:

Tampón de dilución de las muestras:

Tris 50 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM; detergente al 0,1% (polidocanol); ASB al 0,6%, conservante al 0,2% (oxyprion e hidrocloreuro de metilisotiazolona (MIT))

Tampón de lavado:

Tris 10 mM, polidocanol al 0,01%, oxyprion al 0,001%, MIT al 0,001%.

Muestras:

Se obtuvieron sueros humanos, muestras positivas, mediante el cribado de las poblaciones de estudio que se habían tratado con el anticuerpo terapéutico correspondiente; las muestras negativas fueron donantes de sangre sanos no tratados con el anticuerpo terapéutico correspondiente.

Se utilizaron fragmentos Fab de infliximab como antígenos biotinilados. Se detectaron autoanticuerpos (AC anti-ACmT) contra dichos antígenos en un formato de ensayo indirecto. Se utilizaron 50 µg/ml del antígeno biotinilado correspondiente en cada solución de punto aplicado.

Descripción del procedimiento de ensayo:

Las muestras se diluyeron 1:50 con el tampón de dilución de muestras para las mediciones. Las muestras diluidas se incubaron durante 12 min. a 37°C. Tras aspirar la muestra y lavar el campo de ensayo con tampón de lavado, se incubaron con el Mab <IgG ag._h>M-3.022.5-IgM (DSM nº ACC2873), un anticuerpo marcado con digoxigenina (anticuerpo monoclonal marcado con Dig <IgG ag._h> durante 6 min. a 37°C con una etapa de lavado posterior. Tras la incubación con un anticuerpo <Dig> marcado fluorescentemente durante 3 min. a 37°C y posteriormente lavado y secado por succión el campo de ensayo, se detectaron las señales con una cámara de CCD.

Ejemplo 4

Comparación entre los fragmentos F(ab')₂ y Fab en un formato de ensayo indirecto

5 Se aplicaron puntos de infliximab biotinilado, en forma de fragmentos F(ab')₂-Bi o Fab-Bi, sobre un área diferenciada sobre la superficie de un chip (fase sólida). Se utilizó anti-⟨IgG humana⟩ digoxigenado como reactivos de detección. Debido a que el infliximab es una IgG1 humanizada, el anticuerpo de detección se uniría directamente al anticuerpo aplicado en punto. Por lo tanto, únicamente la utilización de fragmentos de infliximab (más en general, anti-⟨fragmentos de anticuerpo de FNTα⟩), F(ab')₂-Bi o Fab-Bi en este formato de ensayo.

10 En total se obtuvieron 100 muestras de suero de donantes de sangre aparentemente sanos (TN) así como 155 muestras de suero de pacientes de artritis reumatoide (AR) tratados con infliximab (VP) con el fin de comparar la especificidad de los dos ensayos diferentes, utilizando los fragmentos de infliximab Fab-Bi o F(ab')₂-Bi como anticuerpos de captura. La utilización de infliximab biotinilado como F(ab')₂-Bi resulta en señales falsamente elevadas en muestras obtenidas de varios donantes de sangre aparentemente sanos (TN) que eran prácticamente tan fuertes como las señales de muestras obtenidas de pacientes de artritis reumatoide verdaderamente positivos (VP) tratados con infliximab (se muestran los resultados en la Tabla 2 y una representación gráfica de los resultados en la figura 5a).

Tabla 2:

Fragmento de infliximab F(ab') ₂ -Bi									
Recuentos	50	500	5000	10000	25000	50000	75000	100000	150000
VN (n=100)	58	26	9	1	3	2	0	0	0
VP (n=155)	0	0	0	0	0	6	1	9	145

20 La utilización de fragmento biotinilado Fab-Bi de infliximab como anticuerpo de captura permitió a los presentes inventores una mucho mejor diferenciación entre muestras verdaderamente positivas (VP) y verdaderamente negativas (VN). Se muestran los resultados en la Tabla 3 y se proporciona una representación gráfica de los resultados en la figura 5b.

Tabla 3:

Fragmento Fab-Bi del infliximab									
Recuentos	50	500	5000	10000	25000	50000	75000	100000	150000
VN (n=100)	87	10	2	0	0	0	0	0	0
VP (n=155)	0	0	0	0	0	6	33	34	82

Ejemplo 5

Ensayos de cribado para la detección de anticuerpos anti-⟨anticuerpo de FNTα⟩ (AC anti-⟨AC de FNTα⟩)

30 Los datos de estudio se basan en muestras de la cohorte Copenhague. Se extrajeron muestras de sangre de un total de 218 pacientes con artritis reumatoide (AR) tratados con infliximab. Se analizaron estas muestras de sangre para la presencia de AC anti-⟨ACmT⟩ de infliximab (AC anti-⟨AC de FNTα⟩). Se obtuvo una muestra de línea base (muestra de referencia) en la semana 0, antes de la primera administración de un ACmT. En el caso de que se indique en la presente memoria que debe obtenerse una muestra en la semana 2 tras la primera administración de un ACmT, la muestra puede obtenerse entre el día 9 y el día 21. En el caso de que se indique en la presente memoria que debe obtenerse una muestra en la semana 6 tras la primera administración de un ACmT, la muestra puede obtenerse entre los días 28 y 64. En el caso de que se indique en la presente memoria que debe obtenerse una muestra en la semana 14 tras la primera administración de un ACmT, la muestra puede obtenerse entre las semanas 13 y 16.

Se determinaron los AC anti-⟨ACmT⟩ utilizando un formato de ensayo indirecto tal como se describe. En el Ejemplo 3 se proporciona una revisión completa de reactivos raros, tampones, calibradores y controles.

45 Formato de ensayo indirecto:

Se aplicó en puntos sobre la superficie de un chip infliximab biotinilado, en forma de Fab-Bi. Se utilizó anti-⟨IgG humana⟩ digoxigenado como reactivos de detección. Debido a que el infliximab es una IgG1 humanizada, el anticuerpo de detección se uniría directamente al anticuerpo aplicado en punto. Por lo tanto, únicamente la utilización de fragmentos de infliximab (más en general, anti-⟨fragmentos de anticuerpo de FNTα⟩), F(ab')₂-Bi o Fab-Bi en este formato de ensayo.

Tal como muestran los resultados del Ejemplo 4, resulta preferente la utilización de fragmentos Fab. En el formato de ensayo indirecto, los fragmentos Fab resultan en una diferenciación mucho mejor entre resultados negativos y verdaderamente positivos.

5 Tabla 4: ensayo indirecto de AC anti- \langle ACmT \rangle (optimizado para sensibilidad)

Punto temporal	Semana 2	Semana 6	Semana 14
Nº de pacientes con resultado de ensayo AC anti- \langle ACmT \rangle^+	4	31	43
Nº de pacientes retirados debido a RFA antes de la semana 50	3	15	16
Porcentaje de abandonos	75%	48%	37%
Nº de pacientes con resultado de ensayo AC anti- \langle ACmT \rangle^-		94	88
Nº de pacientes retirados debido a RFA antes de la semana 50		12	12
Porcentaje de abandonos		13%	14%
Cociente de riesgos (IC al 95%)		5,06 (2,36-10,84)	3,30 (1,54-6,99)
valor de p		< 0,0001	0,0009

10 El formato de ensayo indirecto de AC anti- \langle ACmT \rangle mostrado en la figura 1 con una sensibilidad superior detecta AC anti- \langle ACmT \rangle en muestras obtenidas de pacientes tan pronto como 2 semanas después de la primera administración terapéutica de infliximab. Posteriormente el abandono del estudio debido a una RFA puede predecirse mediante la determinación de AC anti- \langle ACmT \rangle :

El desarrollo temprano de AC anti- \langle ACmT \rangle en la semana 2 o 6 permite predecir una RFA posterior y el abandono de los pacientes del estudio con una probabilidad de 75% y 48%, respectivamente (datos mostrados en la Tabla 4).

15 El tratamiento con un ACmT, por ejemplo el infliximab, conduce a la formación de AC anti- \langle ACmT \rangle contra dicho ACmT en un número menor, aunque significativo, de pacientes. Más importante, un número elevado de estos pacientes abandonaron el estudio debido a RFA en un tiempo posterior. Estos resultados podrían indicar que los anticuerpos antifármaco, evaluados en un método según la presente invención, pueden detectarse antes de que se produzcan RFA y, de esta manera, podría resultar posible utilizar un ensayo positivo para anticuerpos anti- \langle ACmT \rangle para dirigir mejor la terapia, por ejemplo para cambiar de un primer ACmT a un segundo ACmT alternativo.

20

REIVINDICACIONES

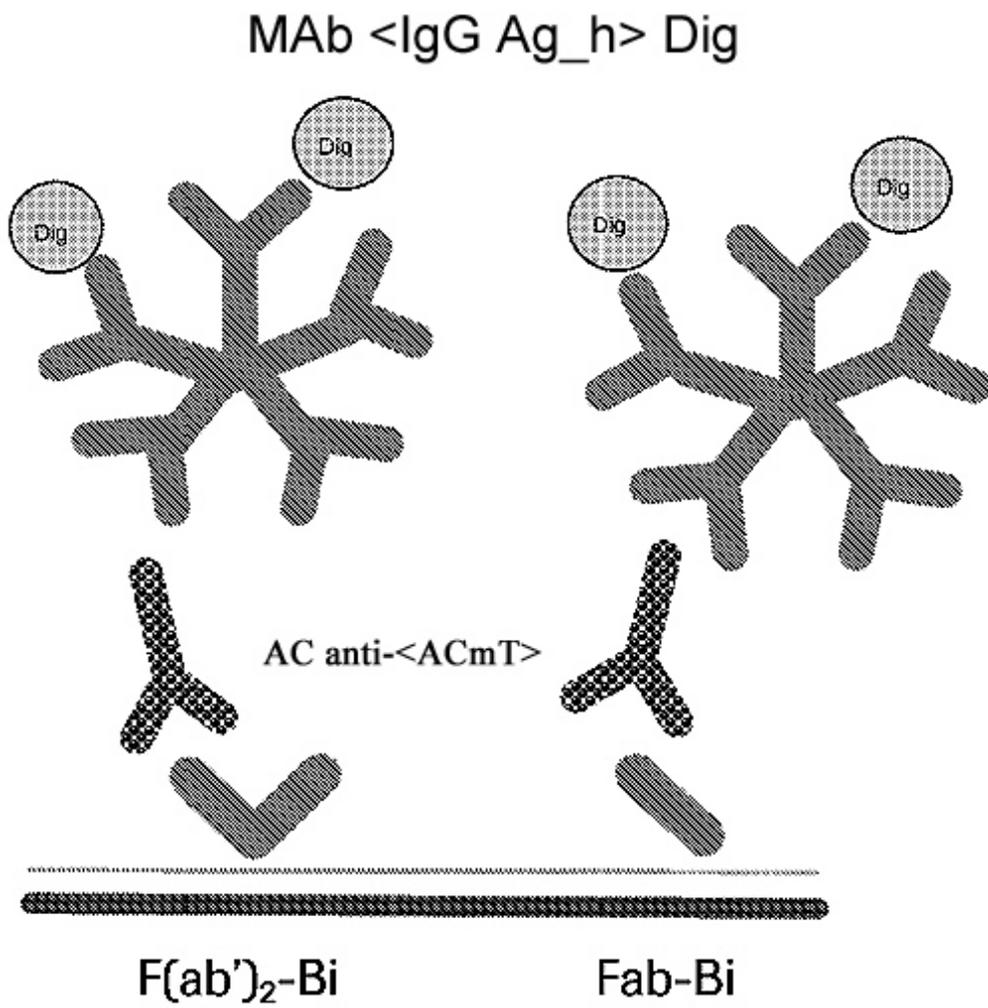
1. Método de inmunoensayo para la determinación de un anticuerpo anti-<anticuerpo monoclonal terapéutico> (anti-AC<ACmT>) in vitro en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal terapéutico (ACmT), comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar un fragmento F(ab) de dicho ACmT unido a una fase sólida,
 b) incubar la fase sólida proporcionada en (a) con la muestra, uniendo de esta manera el AC anti-<ACmT> a la fase sólida mediante el fragmento F(ab),
 10 c) incubar la fase sólida obtenida en (b) con un anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h>, en la que dicho anticuerpo monoclonal se une al AC anti-<ACmT>, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgM que presenta un valor de la constante de disociación ($=K_D$) de entre aproximadamente 10^{-6} moles/l y 10^{-8} moles/l, y
 d) detectar el anticuerpo monoclonal <IgG-Ag_h> unido en (c) y determinar de esta manera el AC anti-<ACmT> en la muestra.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el ACmT se selecciona de entre el grupo que consiste de anticuerpos quiméricos (AQ) y anticuerpos humanizados (AH).
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el ACmT se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento F(ab) se une a la fase sólida mediante un sistema de unión seleccionado de entre el grupo que consiste de biotina/estreptavidina, biotina/avidina y biotina/anticuerpo anti-<biotina>.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que presenta una constante de disociación ($=K_D$) de entre aproximadamente 10^{-7} moles/l y 10^{-8} moles/l.
6. Método según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que se marca el anticuerpo monoclonal <IgG Ag_h>.
- 30 7. Método según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que se marca con Dig el anticuerpo monoclonal <IgG Ag_h>.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo monoclonal marcado con Dig <Ag_h-IgG> se detecta mediante incubación con un anticuerpo anti-<Dig> conjugado con un marcaje detectable.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, en el que el marcaje detectable se selecciona de entre el grupo que consiste de marcajes luminiscentes, marcajes quimioluminiscentes, marcajes electroquimioluminiscentes, marcajes fluorescentes y marcajes radioactivos.
- 40 10. Utilización del método de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la detección de anticuerpos anti-<ACmT>.
- 45 11. Utilización de un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para una identificación de un paciente que se encuentra en riesgo de desarrollar una reacción farmacológica adversa (RFA) durante el tratamiento con un ACmT, en el que el paciente con resultado positivo en el ensayo para un AC anti-<ACmT> en el método se encuentra en riesgo de desarrollar una RFA.
- 50 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que se detecta un AC anti-<ACmT> en una muestra obtenida de un paciente no más tarde de 14 semanas después de la primera administración de dicho primer ACmT.
- 55 13. Método para seleccionar un anticuerpo terapéutico alternativo para un paciente bajo tratamiento con un primer ACmT, en el que se encuentra disponible por lo menos un primer y uno o más ACmT alternativos, que comprende:
 a) determinar según el método de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 in vitro un AC anti-<ACmT> contra el primer ACmT en una muestra de un paciente tratado con dicho primer ACmT, y
 b) seleccionar un ACmT alternativo para la terapia futura, en caso de hallarse presente un AC anti-<ACmT> de dicho primer ACmT.
- 60 14. Método según la reivindicación 13, en el que puede determinarse un AC anti-<ACmT> in vitro en una muestra obtenida de un paciente no más tarde de 14 semanas después de la primera administración de dicho primer ACmT.
- 65 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que el ACmT alternativo se selecciona de entre el grupo que consiste de un anticuerpo monoclonal anti-<FNT α > y rituximab.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el ACmT alternativo se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab, certolizumab y rituximab.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el ACmT alternativo es un anticuerpo monoclonal anti- $\text{FNT}\alpha$.

5 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el ACmT alternativo se selecciona de entre el grupo que consiste de infliximab, adalimumab y certolizumab.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que el primer ACmT alternativo es un anticuerpo monoclonal anti- $\text{FNT}\alpha$ y el ACmT alternativo es el rituximab.

Fig. 1



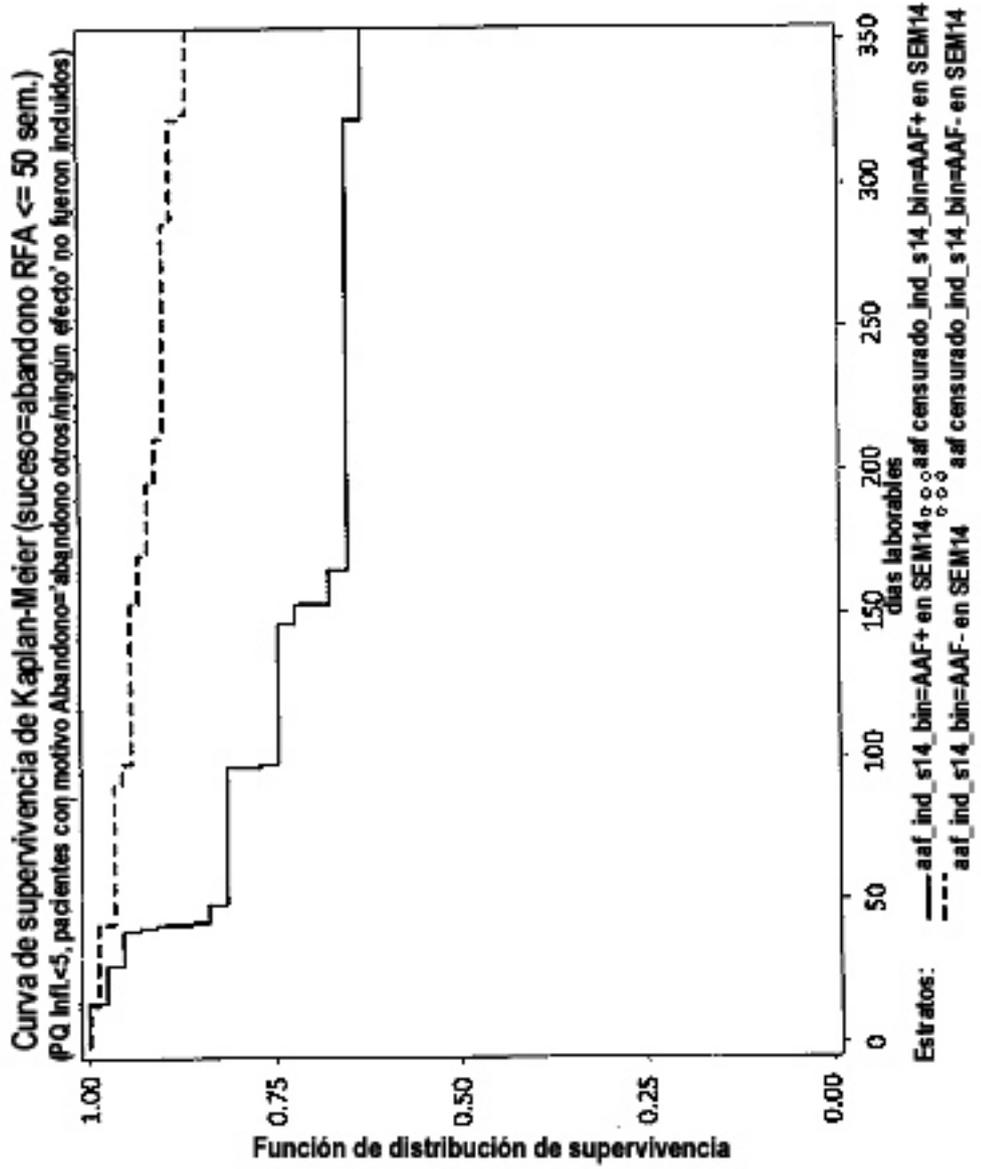


Fig. 3

Fig. 4

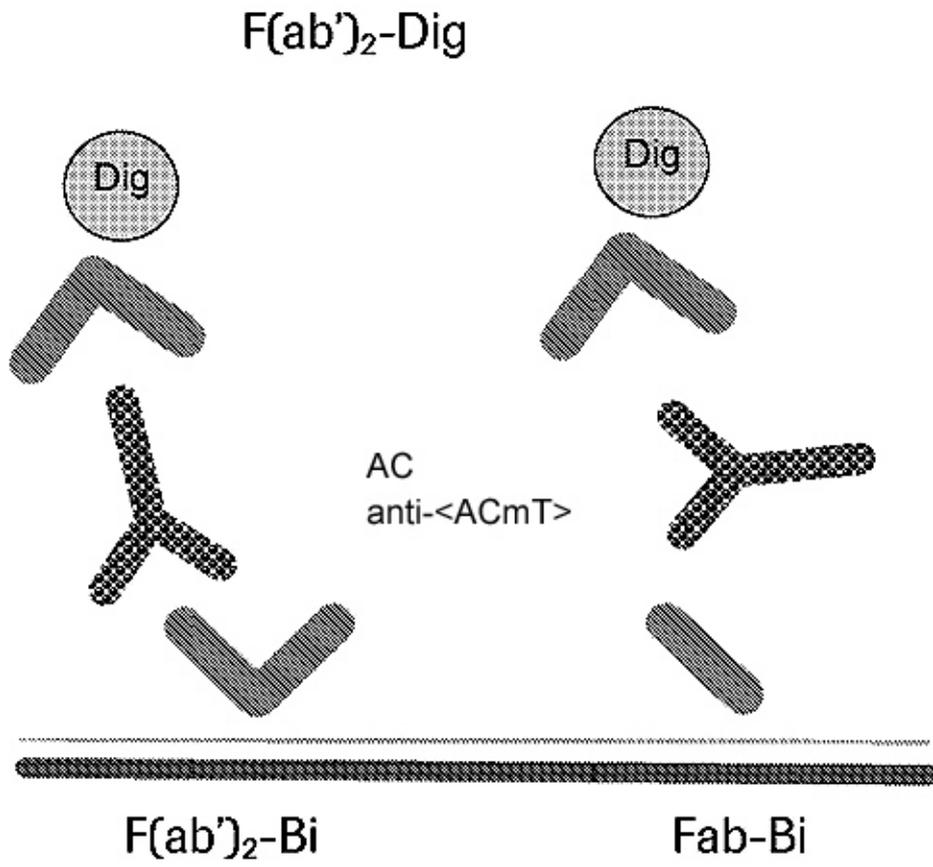


Fig. 5a

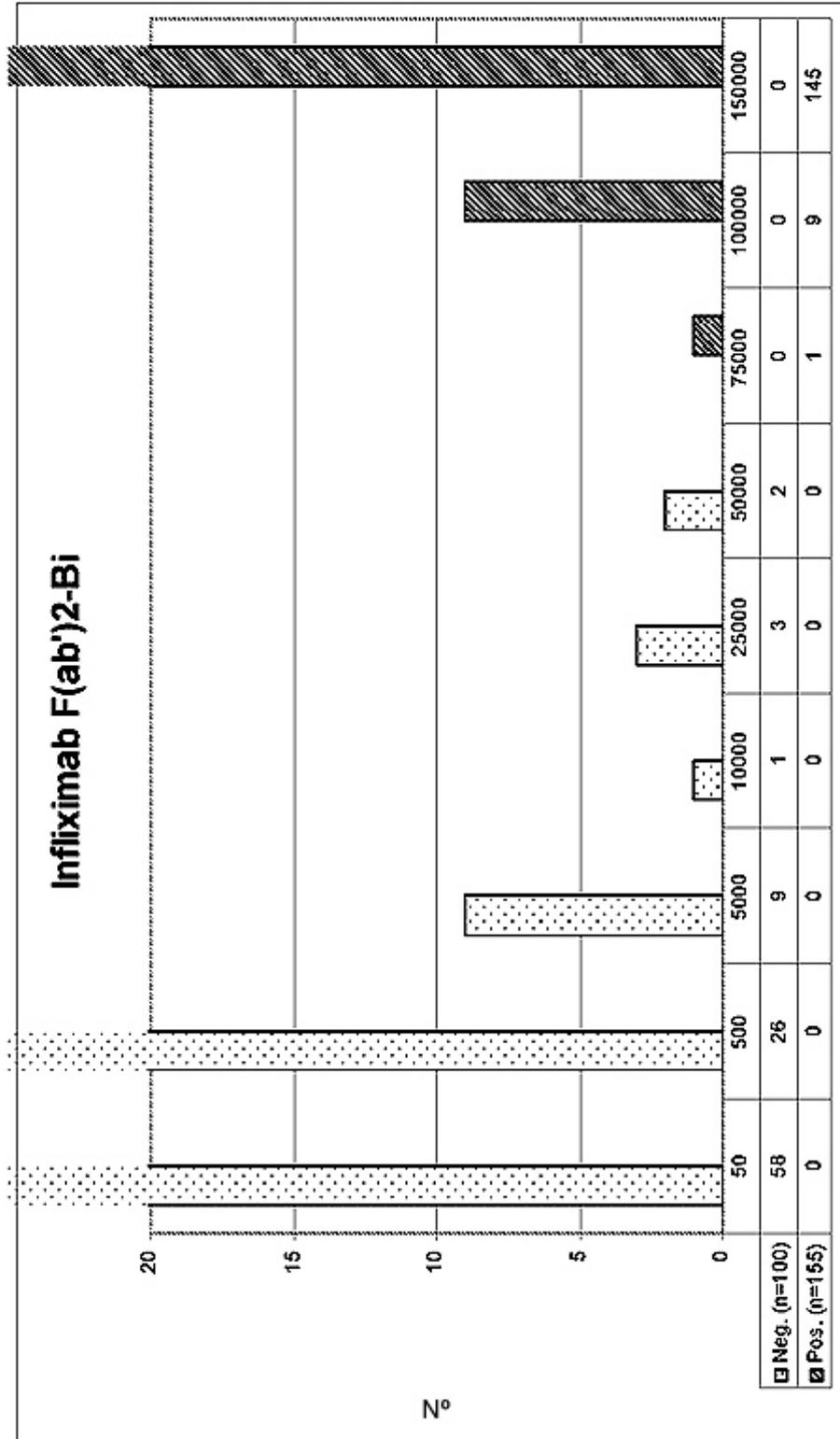


Fig. 5b

