(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 625 881**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2015** **PCT/IB2015/055675**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** **WO16020790**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2015** **E 15767581 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017** **EP 3092497**

(54) Título: **Inmunoensayos de flujo lateral para la detección de anticuerpos contra fármacos biológicos**

(30) Prioridad:

08.08.2014 ES 201431216

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

(73) Titular/es:

PROGENIKA BIOPHARMA, S.A. (100.0%)
Parque Tecnológico de Vizcaya Edificio 504
48160 Derio, Vizcaya, ES

(72) Inventor/es:

MARTINEZ MARTINEZ, ANTONIO;
NAGORE CASAS, DANIEL;
MONASTERIO ASTEINZA, ALBERTO y
TORRES ANTÚNEZ, NEREA

(74) Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 625 881 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

Inmunoensayos de flujo lateral para la detección de anticuerpos contra fármacos biológicos

La presente invención se refiere al área de diagnóstico in vitro. Más precisamente, la presente invención se refiere a inmunoensayos de flujo lateral para la detección de anticuerpos contra fármacos biológicos y métodos y usos de los mismos.

En la última década se ha producido una revolución en el tratamiento de pacientes con diversas enfermedades inmunoinflamatorias, por ejemplo enfermedades artríticas (por ejemplo, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante), enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), enfermedades de la piel (por ejemplo, psoriasis, hidradenitis supurativa), enfermedades no infecciosas del ojo (por ejemplo, el edema macular diabético, degeneración macular relacionada con la edad) y asma refractaria (Furst, DE., y otros, Arthritis Care Res, 2011, 63, 856-864; Jemec, GB., Br J Dermatol, 2013, 168, 233). La citoquina proinflamatoria Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-∀) desempeña un papel crucial en la patogénesis de estas y otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Kopylov, U., y otros, Alimentary pharmacology & therapeutics, 2011, 33, 349-357).

En los últimos años, han emergido fármacos biológicos (por ejemplo anticuerpos monoclonales) como una alternativa prometedora y se espera que ganen importancia en los próximos años (Nelson, T y Smith, D.L., Corporación de información de salud al consumidor, 2008,1-2). Desde la aprobación del primer anticuerpo monoclonal terapéutico contra el TNF-∀ hace quince años, el uso de fármacos biológicos en la práctica clínica ha crecido constantemente. El tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes que son generalmente refractarias a los tratamientos convencionales ha mejorado considerablemente desde que se introdujeron los regímenes de combinación de estos nuevos fármacos biológicos y los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) clásicos (Krieckaert, CL., y otros, Arthritis Res Ther, 2010, 12, 217).

El Infliximab (IFX) es un anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano dirigido contra el TNF-∀. Además, el IFX constituye la primera terapia basada en anticuerpos que fue aceptada para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide (RA por sus siglas en inglés). En la actualidad, su utilización se ha generalizado más y se administra a un número creciente de pacientes en una etapa temprana de la enfermedad. Algunos pacientes responden inicialmente al tratamiento pero su capacidad de respuesta disminuye posteriormente (Bendtzen, K., y otros, Arthritis Rheum, 2011, 63, 867-870). Una de las supuestas razones de este fenómeno es la inmunogenicidad asociada con el propio fármaco en sí; es decir, la respuesta inmunológica del paciente contra el fármaco.

Los fármacos biológicos pueden inducir la formación de anticuerpos neutralizantes (Vincent, FB. y otros, Ann Rheum Dis, 2013, 72, 165-178), lo que da como resultado una pérdida o reducción de la eficacia del tratamiento y la aparición de efectos secundarios, tales como reacciones relacionadas con la infusión (Korswagen, LA., y otros, Arthritis Rheum, 2011, 63, 877-883). Se ha descrito que existe una correlación significativa entre los niveles en suero de los fármacos biológicos (DL), los niveles de anticuerpos contra dichos fármacos (LADA) y la respuesta clínica (Pascual-Salcedo, D., y otros, Rheumatology, 2011, 50, 1445-1452; Plasencia, C., y otros, Ann Rheum Dis, 2012, 71, 1955-1960).

Mientras la cantidad relativa de los anticuerpos contra el fármaco (ADA) sea menor que el nivel mínimo de IFX en suero, el fármaco puede proporcionar un beneficio clínico (de Vries, MK., y otros, Ann Rheum Dis, 2007, 66, 1252-1254). Sin embargo, cuando la producción endógena de anticuerpos excede la cantidad de fármaco en el suero, este último se elimina de la circulación (de Vries, MK., y otros, Ann Rheum Dis, 2007, 66, 1252-1254) y la terapia se vuelve ineficaz. La eliminación acelerada de los fármacos biológicos que forman complejos con anticuerpos puede dar como resultado una disminución de la disponibilidad farmacológica y, finalmente, en la pérdida de eficacia terapéutica del fármaco (Jamnitski, A., y otros, Ann Rheum Dis, 2011, 70, 284-288). Por lo tanto, es muy probable que el equilibrio entre DL (por ejemplo, niveles de IFX) y el LADA regule la eficacia global del fármaco (de Vries, MK., y otros, Ann Rheum Dis, 2007, 66, 1252-1254). Además, la formación de anticuerpos contra fármacos biológicos está fuertemente relacionada con el desarrollo de reacciones relacionadas con la infusión (Pascual-Salcedo, D., y otros, Rheumatology, 2011, 50, 1445-1452). Los pacientes con altos niveles de anticuerpos contra fármacos biológicos tienen un mayor riesgo de padecer una reacción relacionada con la infusión que los pacientes con niveles bajos de anticuerpos contra fármacos biológicos. Las reacciones relacionadas con la infusión se definen como efectos adversos de hipersensibilidad que ocurren durante la infusión de fármacos biológicos o unas pocas horas después de la infusión. Las reacciones relacionadas con la infusión son reacciones de hipersensibilidad de tipo III, que se producen por la deposición en los tejidos de complejos inmunes de fármaco biológico - anticuerpo contra fármaco biológico. Esas deposiciones pueden inducir inflamación y los síntomas incluyen taquicardia, eritema, dificultad para respirar, dolor de cabeza, fiebre, prurito, entre otros.

En la actualidad, se han dado a conocer varios ensayos y tecnologías para el análisis de DL y LADA mínimos (Gorovits, B., AAPS J, 2009, 11, 133-138). Mientras que la mayoría de los métodos proporcionan resultados precisos y sensibles para la medición de DL, se encuentran discrepancias o diferencias entre los diferentes ensayos de ADA dados a conocer en el estado de la técnica:

- El ELISA puente es el análisis más comúnmente utilizado para la detección de inmunogenicidad tanto en el desarrollo de fármacos clínicos como en contextos clínicos (Gorovits, B., AAPS J, 2009, 11, 133-138). El ELISA puente posee una alta especificidad, sensibilidad adecuada y puede ser automatizado. Sin embargo, el ELISA puente es un método altamente susceptible a la interferencia por el fármaco y normalmente no es capaz de detectar ADA de baja afinidad o baja avidez debido a la dilución de la muestra y los múltiples etapas de lavado requeridos por la técnica (Pan, J. y otros, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2011, 63, 150-159).

- Los radioinmunoensayos (RIA) de fase líquida y sólida son métodos sensibles para cuantificar el LADA y son menos propensos a la interferencia de fármacos (Hart, MH., y otros, J Immunol Methods, 2011, 372, 196-203). Sin embargo, estos métodos requieren el uso de instalaciones adaptadas para el uso de radioisótopos. Los RIA de fase sólida para medición de LADA utilizan una estrategia en la que las IgG del suero se unen a proteína A inmovilizada en agarosa y se incuban durante la noche con IFX marcado con 125I, antes de medir la radiactividad (Jamnitski, A., y otros, Ann Rheum Dis, 2011, 70, 284-288). No obstante, hasta la fecha, no existe un estándar humano disponible para construir una curva de calibración para la medición de LADA, por lo que la mayoría de los ensayos proporcionan resultados de respuesta inmune (es decir, LADA) como unidades arbitrarias.

- Los ensayos basados en células pueden proporcionar información sobre la importancia biológica de la respuesta inmune, (es decir, detección de anticuerpos neutralizantes) (Lallemand, C., y otros, J Immunol Methods, 2011, 373, 229-239). Además, se sabe que todos los anticuerpos humanos contra fármacos biológicos tales como IFX y adalimumab son antiidiotípicos y, por lo tanto, neutralizantes por definición (van Schouwenburg, PA., y otros, Ann Rheum Dis, 2012, 72, 104-109). La principal limitación de los ensayos basados en células es que pueden requerir instalaciones para el cultivo celular, almacenamiento a -80°C y un luminómetro, los cuales no están disponibles en un laboratorio clínico.

- Recientemente, se ha dado a conocer que otros métodos, incluidos los ensayos de cambio de movilidad homogénea (HMSA), tienen una tolerancia al fármaco muy alta y detectan ADA en presencia de prácticamente cualquier concentración de fármaco. Por lo tanto, dichos métodos no se limitan a la medición de niveles mínimos (Wang, SL., y otros, J Immunol Methods, 2012, 382, 177-188). Sin embargo, la aplicabilidad de la tecnología específica subyacente a estos métodos en un laboratorio clínico normal es cuestionable.

Para la determinación de LADA, el ensayo basado en ELISA más comúnmente utilizado es el ELISA puente, que se aprovecha de la bivalencia de las inmunoglobulinas (IgG) tipos 1, 2 y 3 para entrecruzar el ADA con moléculas de fármaco tanto inmovilizadas como marcadas (Pascual-Salcedo, D., y otros, Rheumatology, 2011, 50, 1445-1452; Plasencia, C., y otros, Ann Rheum Dis, 2012, 71, 1955-1960). Este es también el formato de ensayo implementado en ensayos ELISA disponibles comercialmente (Llinares-Tello, F., y otros, Rheumatol Int, May 10th, 2014; Chen, DY. y otros, January 17th, 2014). El ELISA puente es también una de las estructuras de ensayo divulgadas en Tornetta, M., y otros. (Tornetta, M., y otros, Journal of Immunological Methods, 2017, 328, 34-44). En dicho documento, se describe la siguiente estructura y etapas para el ensayo de ELISA puente: 1. recubrimiento de la placa: Ab1 (anticuerpo humano dirigido contra IL-13 humana); 2. incubación con anticuerpos anti-fármaco (mAb2, mAb4, dos anticuerpos de hibridoma murino específicos de Ab1 (C188, C189) o anti-suero de mono inmunizado con Ab1 (poly-35); 3. incubación con Ab1 biotinilado; 4. incubación con estreptividina-HRP; y 5. adición de tetrametilbenzidina. Una estructura de ensayo ELISA puente similar se muestra en Abd Serotec (Abd Serotec, “Effective Tools for Drug Monitoring Assays”, 2008, 1-2).

Dicho ELISA puente también se muestra como un método con potencial para la adaptación rutinaria en un entorno clínico hospitalario para la monitorización de pacientes con la prueba de anticuerpos anti-fármaco, de Ruiz-Argüello, B., y otros. (Ruiz-Argüello, B., y otros., Clin Chem Lab Med, 2013, 51(12), e287-e289).

Las pruebas de DL y LADA se realizan principalmente utilizando muestras de sangre recogidas inmediatamente antes de la administración de una nueva infusión para medir los llamados niveles mínimos, es decir, la medición realizada cuando el paciente tiene los niveles más bajos de fármaco presente en el cuerpo cuando a dicho paciente se le administra un fármaco periódicamente.

Las pruebas actuales requieren una extracción clínica de la muestra de suero seguida de un ELISA, lo que precisa de mucho tiempo y trabajo y sólo se realiza en laboratorios especializados. Como consecuencia, los resultados no están inmediatamente disponibles para actuar cuando se administra la infusión programada.

Los nuevos métodos con el formato de prueba en el punto de atención (POC por sus siglas en inglés) proporcionan ventajas sobre las técnicas anteriormente mencionadas, en cuanto a simplicidad y rapidez de la prueba. Aunque se han descrito dispositivos POC para aplicaciones relacionadas con monitorización de terapias con fármacos biológicos, subsisten varios inconvenientes. Por ejemplo, se ha descrito un dispositivo POC como un ensayo rápido de flujo lateral para la monitorización in situ de los niveles mínimos de IFX en suero (Corstjens, PL., y otros, Anal Bioanal Chem, 2013, 405, 7367-7375). El método incluye un procedimiento de tres etapas en tiras con TNF-∀ inmovilizado como molécula de captura: flujo de muestra diluida, flujo de tampón de lavado y flujo de reactivo de marcado. El marcador, partículas de fósforo convertidor luminescente (“up converting phosphor” o UCP) que

recubren la proteína-A, emite una luz visible de 550 nm cuando es excitado con luz infraroja de 980 nm. Las concentraciones de IFX se determinan mediante medición de la fluorescencia de UCP en la línea de prueba. Otro ejemplo es un ensayo inmunocromatográfico desarrollado para la detección de anticuerpos contra el virus de la rabia y con la siguiente configuración o estructura: almohadilla de muestra (en la que se aplica la muestra); almohadilla de conjugado (con el conjugado oro coloidal-RABV G); línea de ensayo (con proteína A estafilocócica) y línea de control (con anticuerpos monoclonales anti-RABV G purificados por afinidad).

También se ha descrito un ensayo de flujo lateral para la detección de ADA generados contra IFX (Pan, J. et.al., Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2011, 63, 150-159). El ensayo comprende una etapa de preincubación de las muestras de suero tanto con fármaco (por ejemplo IFX) covalentemente ligado a biotina como fármaco (por ejemplo IFX) covalentemente ligado a hapteno orgánico. Dicha mezcla se aplica a una tira de prueba que contiene partículas de oro liberables recubiertas de estreptavidina que se han secado en una almohadilla unida a una membrana que comprende una zona o línea de prueba con anticuerpos anti-haptenos. El resultado de la prueba se puede detectar mediante la presencia o ausencia de una línea roja visible formada en la zona o línea de prueba. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, este ensayo requiere una etapa de preincubación que dura varias horas y no permite, por lo tanto, obtener resultados inmediatos para la toma de decisiones sobre la aplicación de la siguiente dosis del tratamiento.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de una herramienta de diagnóstico que permita la detección rápida o casi instantánea y simple de LADA con la mínima manipulación de la muestra, permitiendo así una monitorización más frecuente y una administración personalizada y mejor del fármaco biológico, basada en los niveles mínimos del paciente justo antes de la próxima administración.

Los inventores de la presente invención han encontrado una estructura de inmunoensayo de flujo lateral que supera todos los inconvenientes del estado de la técnica. Más específicamente, el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención es pequeño, portátil, simple, rápido, fácil de usar y rentable. Además, no necesita de un operario cualificado, equipo adicional o manipulación adicional de la muestra extraída del paciente y, por lo tanto, reduce dramáticamente el tiempo y los recursos necesarios para determinar si un individuo tiene ADA. Por lo tanto, la presente invención permite una detección cualitativa rápida, casi instantánea, in situ de ADA en pacientes que simplifica y acelera las decisiones clínicas en el curso de una terapia biológica en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, dando la posibilidad de tomar decisiones sobre la administración de la siguiente dosis de fármacos biológicos sobre la base de los resultados del ensayo.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de ADA basado en un sistema inmunocromatográfico.

En otras realizaciones, la presente invención da a conocer un dispositivo para llevar a cabo dicho inmunoensayo de flujo lateral.

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso del inmunoensayo de flujo lateral según la presente invención para la detección de ADA en una muestra de un paciente y, por lo tanto, a la predicción de una reducción o pérdida en la efectividad de la terapia que se administra a dicho paciente.

En otra realización, la presente invención da a conocer un método de modulación de un tratamiento con fármaco biológico administrado a un paciente que lo precisa basándose en el resultado del inmunoensayo de flujo lateral mencionado anteriormente.

Además, la presente invención también se refiere a un método de predecir si un paciente responderá o no a un tratamiento o una dosis adicional de un tratamiento en base al resultado del inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para determinar si un paciente debe recibir una dosis adicional de un tratamiento en base al resultado del inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "muestra biológica", "muestra" y sus plurales se utilizan indistintamente y se refieren a una muestra obtenida de un paciente o un individuo que debe ensayarse para la presencia de ADA.

Tal como se utilizan en el presente documento, "fármaco", "fármaco biológico" y sus plurales se utilizan indistintamente y se refieren a fármacos que comprenden o consisten en moléculas biológicas o material biológico, es decir, proteínas, polipéptidos, péptidos, polinucleótidos, oligonucleótidos, polisacáridos, oligosacáridos y fragmentos de los mismos, así como células, tejidos, fluidos biológicos o extractos de los mismos, y que inducen anticuerpos en pacientes.

Tal como se utilizan en el presente documento, el término "infliximab" se refiere al anticuerpo monoclonal quimérico infliximab, el cual es la parte activa de muchas moléculas de marca y fármacos biosimilares, tales como, pero sin limitación a los mismos, Remicade®, Remsima® e Inflectra®, y también a los fragmentos de dicha molécula que inducen una respuesta inmunológica en pacientes que es similar a la obtenida con IFX completo.

Tal como se utilizan en el presente documento, el término "membrana" y su plural se refieren a una superficie de apoyo en la que el fármaco biológico y, si es necesario, el fármaco biológico conjugado con un marcador detectable puede aplicarse según métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, unión covalente y/o secado, respectivamente.

Tal como se utilizan en el presente documento, el término "modular" y su plural y derivados se refieren a aumentar, disminuir o mantener una determinada cantidad.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "paciente" e "individuo" y sus plurales se usan indistintamente para referirse a sujetos a los que se realizan pruebas de la presencia de ADA.

Tal como se utilizan en el presente documento, "tratamiento" y su plural se refieren a tratamientos basados en fármacos biológicos o que comprenden el uso de uno o más de los mismos.

Tal como se utilizan en el presente documento, "nivel mínimo" y su plural se refieren al nivel de concentración más bajo en el que un fármaco está presente en el cuerpo. Los fármacos biológicos, tales como Infliximab, se administran periódicamente (por ejemplo, cada ocho semanas, aproximadamente), por lo tanto, un nivel mínimo de un fármaco biológico, como Infliximab, se produce en el momento justo antes de la infusión de la siguiente dosis. El momento óptimo para la prueba de los niveles mínimos es el día en que el paciente acude al hospital de día para recibir el tratamiento, antes de la infusión, o dentro de las 24 horas anteriores a la infusión, o dentro de las 48 horas anteriores a la infusión, o dentro de las 72 horas anteriores a la infusión.

La figura 1 muestra una vista esquemática del inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención con las, como mínimo, tres áreas que comprende la membrana o tira reactiva: una primera área llamada almohadilla de muestra en la que se aplica la muestra que va a ser examinada para detectar la presencia de ADA (1); una segunda área denominada área de conjugado en la que se coloca el fármaco biológico conjugado a un marcador (2); y una tercera área en la que el fármaco biológico está inmovilizado en la membrana o tira reactiva para actuar como reactivo de captura (3).

La figura 2 muestra una estructura ejemplar de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención en la que A es la almohadilla absorbente distal, B es la membrana de nitrocelulosa, C es la almohadilla de conjugación y D es la almohadilla de separación de sangre.

La figura 3 muestra los resultados de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención para una muestra de suero negativa obtenida de un individuo sano (A) y una muestra de suero positiva obtenida de un paciente tratado con infliximab y que contiene 753 U/ml de ADA contra IFX (B).

La figura 4 muestra los resultados de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención para un una muestra de sangre entera negativa (A) y positiva dopada con suero que contiene 241 U/ml de ADA contra IFX (B).

La figura 5 muestra resultados de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención con una serie de diluciones 1:1 a partir de una muestra de suero positiva que contiene 506 U/ml de ADA contra IFX, preparada mediante dilución seriada en un suero negativo (A) (CL indica línea control; TL indica línea de prueba). Dichos resultados fueron analizados mediante interpretación visual por puntuación Rann (B) y por lectura con un escáner (puntuación Camag) (C). En la figura 5 (B) el eje x muestra U de ADA contra IFX/ml de suero y el eje y muestra la puntuación Rann. En la figura 5 (C) el eje x muestra U de ADA contra IFX/ml de suero y el eje y muestra los datos Camag. De derecha a izquierda en la figura 5 (A), (B) y (C), las concentraciones de ADA en las muestras aplicadas a las tiras son de: 506 U/ml, 253 U/ml, 127 U/ml, 63 U/ml, 32 U/ml, 16 U/ml y 0 U/ml).

La figura 6 muestra los resultados de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención con una muestra de sangre positiva para anticuerpos contra infliximab, preparada dopando sangre entera con un suero positivo que contiene 384 U/ml de ADA contra IFX y posteriores diluciones seriadas 1:1 de la muestra de sangre dopada con sangre negativa contra IFX, preparada mediante dilución seriada en un suero negativo (A) (CL indica línea control; TL indica línea de prueba). Dichos resultados se analizan mediante interpretación visual por puntuación Rann (B) y por lectura con un escáner (puntuación Camag) (C). Las figuras 6 (B) y (C) también muestran los resultados obtenidos para la misma dilución seriada realizada solamente con suero. En la figura 6 (B), el eje x muestra U de ADA contra IFX/ml de suero o sangre entera dopada y el eje y muestra la puntuación Rann. En la figura 6 (C) el eje x muestra U de ADA contra IFX/ml de suero o sangre entera dopada y el eje y muestra los datos Camag. De derecha a izquierda en la figura 6 (A), (B) y (C), las concentraciones de ADA en las muestras aplicadas a las tiras son: 384 U/ml, 192 U/ml, 96 U/ml, 48 U/ml, 24 U/ml, 12 U/ml y 0 U/ml). Además, en las figuras 6 (B) y (C), las barras blancas

hacen referencia a muestras de serum y las barras en diagonal hacen referencia a muestras de sangre entera (ambas dopadas o no suero positivo).

Por lo tanto, tal como se indicó anteriormente, uno de los aspectos de la presente invención se refiere a un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de ADA contra un fármaco biológico, basado en un sistema de inmunocromatografía, que comprende: una membrana que comprende:

- un área de captura;
- un área de aplicación de muestra;
- una trayectoria de flujo desde el área de aplicación de muestra al área de captura; y
- un área de conjugado en la trayectoria de flujo, caracterizada porque el área de conjugado comprende dicho fármaco biológico marcado de forma detectable y el área de captura comprende dicho fármaco biológico inmovilizado.

En una realización preferente, el fármaco biológico es un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano, humanizado fragmentos humanos Fab o fusión de moléculas utilizadas en la terapia contra la enfermedad autoinmune y/o inflamatoria. En la realización más preferente, el fármaco biológico es IFX. Por lo tanto, en la realización preferente, la presente invención se refiere a un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de ADA contra IFX que comprende IFX marcado de forma detectable en el área de conjugado e IFX inmovilizado en el área de captura. La membrana utilizada en el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención puede estar hecha de una variedad de materiales por los que la muestra que va a ser examinada puede pasar o moverse y que son conocidos por una persona experta en la materia. Por ejemplo, los materiales utilizados para formar la membrana pueden incluir, pero sin limitación a los mismos, materiales naturales, sintéticos o que ocurren naturalmente y son modificados sintéticamente, tales como los polisacáridos (por ejemplo, materiales de celulosa como papel y derivados de celulosa como acetato de celulosa y nitrocelulosa); sulfona poliéter; nilón; sílice; materiales inorgánicos, tales como alúmina desactivada, tierra de diatomeas, $MgSO_4$ u otros materiales inorgánicos finamente divididos uniformemente dispersados en una matriz de polímero porosa tales como cloruro de vinilo, copolímero de cloruro de vinilo-propileno y copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo; paño, tanto de origen natural (por ejemplo, algodón) como sintético (por ejemplo, rayón); geles porosos, tales como gel de sílice, agarosa, dextrano y gelatina; películas poliméricas, como poliacrilamida; y similares. En una realización preferente, la membrana es una membrana de nitrocelulosa. Existen diferentes tipos de membranas de nitrocelulosa comercialmente disponibles según su capacidad absorbente y flujo capilar, por ejemplo, MDI® 15 µ SS12, Sartorius® CN140, Millipore® HF180, Sartorius® CN150, MDI® 5 µ SN12, MDI® 8 µ SN12, MDI® 10 µ SN12, MDI® 150-SS40, MDI® 200-CNPH-SS60, Whatman® FF170, Whatman® FF120 y similares. En la realización más preferente, la membrana de nitrocelulosa es MDI® 8 µ SN12.

En una realización preferente, el área de captura comprende una o más líneas de prueba que comprenden el fármaco biológico inmovilizado. En la realización preferente, el área de captura comprende una línea de prueba.

Dicho fármaco puede ser inmovilizado en la membrana por medios conocidos por la persona experta en el estado de la técnica. En una realización particular, el fármaco biológico (por ejemplo, IFX) está inmovilizado en la membrana en una concentración de 1 mg/ml a 3 mg/ml, preferentemente de 1 mg/ml, utilizando una solución tampón de inmovilización apropiada, por ejemplo, solución tampón salina de borato (BBS), sacarosa, tampón carbonato pH 10,5 más sacarosa y NaCl 150 mM, solución salina tamponada con borato más 1 mg/ml de IgG de conejo, tampón carbonato pH 10,5 más sacarosa, BBS más 3% de sacarosa, BBS más 1% albúmina de suero bovino, BBS más 3% trehalosa, BBS más 1% caseína (alcalizada), BBS más 1% caseína, o similares, preferentemente BBS. IFX se diluye en dicho tampón de inmovilización apropiado y las tarjetas laminadas con tiras de nitrocelulosa se laminan para producir la línea de ensayo con la solución de IFX mencionada anteriormente a una velocidad calculada para proporcionar un rendimiento óptimo utilizando una máquina de isoflujo de mesa “bench-top iso-flow machine”. Una vez recubiertas, las tiras de nitrocelulosa se colocan inmediatamente en un horno de secado a 37ºC para incubación durante la noche (por ejemplo, durante 16-24 horas) para asegurar que IFX se inmoviliza adecuadamente a la nitrocelulosa.

También se contempla que el área de captura comprenda una o más líneas de control que comprendan moléculas de control inmovilizadas, para confirmar que el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención ha funcionado correctamente y, por tanto, los resultados proporcionados por una o más líneas de prueba son creíbles y correctos. La inmovilización de dichas moléculas de control se realiza tal como se explicó anteriormente. En una realización preferente, el área de captura comprende una línea de control que comprende anticuerpos contra IgY de pollo inmovilizados por cualquiera de los medios mencionados anteriormente. En una realización preferente, el área de conjugado está formada por una almohadilla de conjugado que comprende el fármaco biológico marcado de forma detectable. Se contempla que dicha almohadilla esté hecha de un material esponjoso, poroso o fibroso capaz de absorber el líquido rápidamente. La porosidad del material puede ser unidireccional (por ejemplo, con los poros o fibras total o predominantemente paralelas a un eje de la estructura) o multidireccional (por ejemplo, omnidireccional, de manera que el miembro tenga una estructura parecida a una esponja amorfa). Puede utilizarse material plástico poroso, como polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliéster, vinilacetato de etileno, acrilonitrilo y politetrafluoroetileno. Puede ser ventajoso tratar previamente el material con un agente surfactante durante su

fabricación, ya que esto puede reducir cualquier hidrofobicidad inherente en el material y, por lo tanto, mejorar su capacidad para recoger y entregar una muestra húmeda rápida y eficientemente. La estructura porosa también puede hacerse de papel u otros materiales celulósicos, tales como nitrocelulosa. Preferentemente, el material elegido es tal que el material poroso puede saturarse con el líquido acuoso en cuestión de segundos. También, preferentemente, el material se mantiene robusto cuando se humedece. En una realización preferente, la almohadilla de conjugado está hecha de poliéster.

En una realización, dicha almohadilla de conjugado está posicionada en comunicación fluida con la membrana y, más preferentemente, dicha almohadilla de conjugado está montada en la membrana cubriendo parcialmente o totalmente la membrana.

Se contempla que el fármaco biológico marcado de forma detectable se deposite en la membrana. En una realización, dicho fármaco biológico marcado de forma detectable se deposita en la almohadilla superficialmente formando, así, una capa superficial. En otra realización, el fármaco biológico marcado de forma detectable depositado en la almohadilla puede penetrar hasta la membrana y, en algunos casos, también puede penetrar en dicha membrana.

En otra realización, el fármaco biológico marcado de forma detectable se deposita directamente en la membrana.

En una realización adicional, el fármaco marcado de forma detectable se coloca en la membrana o en la almohadilla de conjugado por medio de técnicas y procedimientos conocidos por la persona experta en el estado de la técnica. En la realización más preferente, dicho fármaco biológico marcado de forma detectable se rocía o deposita sobre la membrana en el área de conjugado o en la almohadilla situada en el área de conjugado, más preferentemente se rocía. A continuación, el fármaco biológico marcado de forma detectable que se ha depositado se seca. Dicho secado se realiza preferentemente a 37ºC durante 20 minutos.

Además, el fármaco biológico situado en el área de conjugado puede marcarse con cualquier parte o reactivo que permite la detección directa, es decir, sin necesidad de aplicar más reactivos, reduciendo, por lo tanto, la manipulación de la muestra y el número de interacciones o reacciones necesarias para obtener una señal detectable.

Dicho marcado detectable puede ser enlazado/unido al fármaco biológico de manera covalente o no-covalente. El acoplamiento/unión puede realizarse por cualquier método conocido en el estado de la técnica.

En una realización preferente, el marcador detectable es una partícula coloidal de metal, más preferentemente una partícula coloidal de oro, por ejemplo, micropartículas de oro o nanopartículas de oro. En la realización más preferente, las partículas coloidales de oro utilizadas como marcador detectable tienen un diámetro de entre 20 nm y 80 nm, incluso más preferentemente, de 20 nm a 40 nm. En la realización más preferente, se utilizaron partículas coloidales de oro de 40 nm de diámetro para marcar el fármaco biológico (por ejemplo, IFX) y se utilizaron partículas coloidales de oro de 20 nm de diámetro para marcar la molécula de control (por ejemplo, IgY de pollo).

En una realización preferente, cuando las partículas coloidales de oro se utilizan como marcador detectable, la concentración del fármaco biológico conjugado con dichas partículas depositadas en el área de conjugado o la almohadilla de conjugado es de 10 unidades de oro a 120 unidades de oro, más preferentemente 70 unidades de oro, según unidades internacionales. En otra realización preferente, la concentración del fármaco biológico (por ejemplo, IFX) conjugado con dichas partículas coloidales de oro depositadas en la área del conjugado es de 40 unidades de oro y la concentración de la molécula control (por ejemplo, IgY) conjugado con dichas partículas coloidales de oro depositadas en la área del conjugado es de 15 unidades de oro, de acuerdo con las unidades internacionales.

Brevemente, las Unidades de Oro se miden diluyendo el concentrado de fármaco biológico conjugado con el tampón de resuspensión conjugado (por ejemplo, tampón sodio fosfato) y midiendo la densidad óptica (DO) a una longitud de onda específica de 520 nm utilizando un espectrofotómetro, habiendo realizado previamente un blanco contra el tampón de re-suspensión de conjugado. La DO del fármaco biológico conjugado es posteriormente utilizada como una medida de la cantidad total de oro añadido en cada ensayo. Por ejemplo, 1 µl de DO de 20 unidades de conjugado es igual a 20 Unidades de Oro. Por lo tanto, para un requerimiento de 70 unidades de oro por ensayo, 3,5 µl de líquido conjugado se requieren para una tira de prueba a partir de una DO calculada de 20 unidades del concentrado de fármaco biológico conjugado.

La detección del marcador detectable dependerá de la molécula o reactivo elegido y puede hacerse por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, inspección visual, espectrofotometría ultravioleta y visible, fluorimetría, conteo de radiactividad o similares. En una realización preferente, cuando las partículas de oro se utilizan como marcados detectables, los resultados del ensayo son obtenidos y analizados mediante inspección visual.

En otra realización, el área de conjugado comprende también moléculas de control marcadas de forma detectable que fluirán con la muestra sin reaccionar con el contenido de la misma y se unen a la una o más líneas de control para confirmar si el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención ha funcionado correctamente y, por tanto, los resultados proporcionados por una o más líneas de prueba son creíbles y correctos. La molécula utilizada depende de la que esté inmovilizada en la, como mínimo, una línea de control del área de captura. Además, los marcadores utilizados para las moléculas de control y marcado son tal como se explicó anteriormente.

En una realización preferente, tal como se mencionó anteriormente, el área de captura comprende una línea de control que comprende anticuerpos contra IgY de pollo inmovilizados y, por lo tanto, el área de conjugado comprende inmunoglobulina Y (IgY) de pollo marcada de forma detectable.

En una realización, el marcador utilizado para las moléculas de control puede ser el mismo que el utilizado para los uno o más fármacos biológicos probados, siempre y cuando sea posible distinguir los resultados obtenidos para cada fármaco por otros medios, por ejemplo, a través de la posición de la línea de prueba. En otra realización, el marcador utilizado para las moléculas de control es diferente al utilizado para los uno o más fármacos biológicos probados, lo que proporciona una señal distinguible.

En una realización preferente, el área de aplicación de muestra está formada por una almohadilla de muestra que se encuentra antes del área de conjugado y está en comunicación fluida con dicha área de conjugado, más preferentemente, dicha almohadilla de muestra recubre parcialmente o totalmente el área de conjugado o está recubierta parcial o totalmente por el área de conjugado. En otra realización, la almohadilla de muestra está montada en la membrana o en la almohadilla de conjugado.

Además, se contempla que el área de aplicación de muestra esté adaptada a la muestra biológica que se pretende analizar. Por ejemplo, en el caso de la muestra biológica para el análisis sea sangre entera, el área de aplicación de muestra puede comprender una almohadilla de separación de sangre para la recepción de la muestra, en la que el sistema de separación de sangre se acopla de manera fluida a la estructura de conjugado. En una realización, la almohadilla de separación de sangre recubre parcial o totalmente la almohadilla de conjugado.

En una realización preferente, la muestra de sangre entera se deposita en la almohadilla de separación de sangre hecha, por ejemplo, de material/ almohadilla absorbente que se acopla de manera fluida al área de conjugado. Por ejemplo, la almohadilla de separación de sangre puede funcionar como un filtro, por ejemplo, para eliminar los glóbulos rojos y otros componentes celulares y sólidos como fibrina y coágulos son separados de la muestra. A continuación, la muestra filtrada puede llegar al área de conjugado. La almohadilla de separación de sangre también puede funcionar como un absorbente que elimina de la muestra por adsorción factores que interfieren. Existen varias almohadillas de separación de sangre disponibles comercialmente, por ejemplo, MDI® FR-1 (0,6), MDI® FR-1 (0,35), Whatman® MF-1, Ahlstrom® Cytosep 1660, Ahlstrom® Cytosep 1662, almohadilla de papel tratada con PHA, o similares. En la realización más preferente, la almohadilla de separación de sangre utilizada es MDI® FR-1 (0,6).

En otra realización preferente, se proporciona una almohadilla absorbente distal unida de manera fluida a la membrana. Dicha almohadilla absorbente distal está configurada para absorber el líquido o fluido proveniente de la membrana y, por lo tanto, hace que la muestra se mueva desde el área de aplicación de muestra a dicha almohadilla absorbente distal circulando a través de toda la estructura del inmunoensayo de flujo lateral, es decir, pasando por el área de conjugado y el área de captura. Por lo tanto, esta almohadilla absorbente distal puede estar hecha de cualquier material absorbente, por ejemplo, papel Whatmann®, papel de filtro o papel de cromatografía. En una realización preferente, el material absorbente es papel de filtro, más preferentemente el papel de filtro es una almohadilla de papel de Ahlstrom® (código de producto 222), que tiene un comportamiento o rendimiento ventajoso porque es relativamente delgada y tiene un carácter altamente absorbente ya que está hecha de papel comprimido.

En una realización adicional, el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención puede detectar ADA contra dos o más fármacos biológicos. En este caso, el área de captura comprendería, como mínimo, una línea de prueba para cada uno de los fármacos biológicos analizados, con el fármaco biológico correspondiente inmovilizado en cada una. Además, en el área de conjugado se proporcionarían cada uno de los fármacos biológicos marcados de forma detectable. El marcador utilizado para cada uno de los fármacos biológicos y el marcado pueden ser tal como se ha descrito anteriormente. Además, se contempla que los marcadores utilizados para los diferentes fármacos biológicos probados sean el mismo, siempre y cuando sea posible distinguir los resultados obtenidos para cada fármaco por otros medios, por ejemplo, mediante la posición de la línea de prueba. En otra realización, los marcadores utilizados para cada uno de los fármacos biológicos son diferentes, de manera que cada una de ellos de una señal distinguible.

En una realización preferente, el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención permite la detección de ADA de cualquier isotipo presente en un paciente, es decir, IgG, IgA, IgE, IgM e IgD. Más preferentemente, el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención permite la detección de ADA del isotipo IgG y, aún más preferentemente, IgG de tipos 1, 2 y/o 3, que es el isotipo principal que caracteriza la respuesta inmune a un fármaco biológico.

En otra realización, el inmunoensayo de flujo lateral basado en un ensayo de inmunocromatografía descrito anteriormente, es en forma de una tira de prueba de inmunocromatografía.

En una realización particular, para los inmunoensayos de flujo lateral y tiras de prueba de inmunocromatografía de la presente invención, la muestra biológica, preferentemente sangre entera, se deposita directamente en el área de aplicación de muestra. Por ejemplo, una gota de sangre entera (de 20 µl a 40 µl, preferentemente 30 µl) obtenida de un pinchazo de dedo (por ejemplo utilizando una aguja), sin ningún tipo de dilución previa o tratamiento previo de la muestra con reactivos o soluciones, es suficiente para el uso y análisis con el inmunoensayo de flujo lateral y tiras de prueba de inmunocromatografía descritas anteriormente. No se requiere extracción adicional de suero o plasma.

A continuación, un simple tampón de arrastre, más preferentemente, tampón PBS estándar, se deposita en el área de aplicación de muestra para permitir que la muestra de sangre fluya por capilaridad a lo largo del ensayo o la tira por la trayectoria del flujo para reaccionar con los reactivos químicos y componentes utilizados en el inmunoensayo de flujo lateral. Preferentemente, se añaden 100 µl de tampón de arrastre. Dicho tampón de arrastre puede agregarse por cualquier medio disponible para una persona experta en el estado de la técnica, por ejemplo una pipeta de laboratorio ajustada a 100 µl o una pipeta de plástico más simple. El tampón de arrastre puede agregarse 60 segundos después de depositar la muestra, más preferentemente 50 segundos después de depositar la muestra, aún más preferentemente 40 segundos después de depositar la muestra y de la forma más preferente 30 segundos después de depositar la muestra.

Cuando se utiliza suero o plasma para el análisis con cualquiera de los inmunoensayos de flujo lateral de la presente invención, se pueden añadir entre 10 µl y 20 µl, preferentemente 15 µl de muestra al área de aplicación de muestra y se realiza el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Para usar cualquier otra muestra biológica con el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención, por ejemplo líquido intersticial, saliva, fluido ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, semen, fluido vaginal, líquido amniótico o similares, la persona experta en el estado de la técnica posee habilidades para determinar la cantidad de muestra necesaria para realizar correctamente los ensayos descritos anteriormente. En primer lugar, tal como se mencionó anteriormente, la muestra biológica se deposita en el área de aplicación de muestra y el fluido entrará en contacto con la almohadilla de muestra, si está presente. La almohadilla de muestra (por ejemplo, una almohadilla de muestras de sangre) actúa como un filtro para los componentes sólidos, permitiendo el flujo del componente líquido. El área de conjugado, más preferentemente en la forma de una almohadilla de conjugado en la que se deposita el fármaco biológico conjugado, preferentemente IFX, se encuentra después del área de aplicación de muestra (puede estar situada parcialmente superpuesta con la almohadilla de muestra), con ambas almohadillas montadas en la tira de membrana, preferentemente hecha de nitrocelulosa. El fármaco biológico conjugado con un marcador detectable, preferentemente partículas coloidales de oro, reconocerá, reaccionará con y se unirá a los ADA contra dichos fármacos biológicos presentes en la muestra biológica, si están presentes. Por lo tanto, se formarán inmunocomplejos fármaco biológico-ADA que estarán conjugados con partículas coloidales de oro.

Como se ha mencionado anteriormente, opcionalmente, una molécula de control, también conjugada con un marcador detectable, preferentemente partículas coloidales de oro, pueden depositarse también en la almohadilla de conjugado. En un realización preferente, dicha molécula de control es inmunoglobulina Y (IgY) de pollo. Si está presente, esta molécula de control, en esta etapa, no reconocerá, reaccionará con ni se unirá específicamente a los componentes presentes en la muestra biológica.

La muestra de líquido que contiene los inmunocomplejos fármaco-ADA conjugados con partículas coloidales de oro y, opcionalmente, la molécula de control conjugada con partículas coloidales de oro, fluirá por la trayectoria de flujo desde la almohadilla de conjugado hacia la tira de nitrocelulosa en la que los elementos de captura están inmovilizados en la que, como mínimo, una línea de prueba y, opcionalmente, también en la, como mínimo, una línea de control.

La, como mínimo, una línea de prueba comprende un reactivo de captura específico que, tal como se ha mencionado anteriormente, es la misma molécula de fármaco biológico presente en la almohadilla de conjugado, preferentemente IFX, inmovilizada en la tira de la membrana. La naturaleza bivalente de las moléculas de ADA presentes en la muestra, preferentemente IgG, permite la reacción de los inmunocomplejos fármaco-ADA conjugados con partículas coloidales de oro con el fármaco biológico inmovilizado que se unirá a dichos inmunocomplejos por el epítopo disponible en las moléculas de ADA, si están presente en la muestra biológica. Se deja que la prueba o ensayo se desarrolle de 5 a 60 minutos, más preferentemente 30 minutos.

Por lo tanto, cuando las reacciones descritas ocurren, una banda roja será visualmente distinguible en la, como mínimo, una línea de prueba del inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención como resultado del puente de unión específico entre los ADA y el fármaco biológico presentes en el área de conjugado y en el área de captura. Este resultado positivo será indicativo de la presencia de ADA en la muestra biológica probada.

La, como mínimo, una línea de control opcional comprende un reactivo de captura específico que es una molécula, inmovilizada en la tira de la membrana, que reacciona con la molécula de control. En una realización preferente, dicho reactivo es anticuerpo contra IgY de pollo. Tendrá lugar una reacción entre el anticuerpo contra IgY de pollo inmovilizado y el anticuerpo IgY de pollo que migra con el líquido de la muestra. Una banda roja será visualmente distinguible en la línea de control del dispositivo como resultado de esta unión entre las moléculas de control y validará el resultado en la línea de prueba. Dichos resultados se miden de manera visual, preferentemente mediante puntuación Rann; y/o mediante un lector o escáner que utiliza un método desitométrico para el análisis, preferentemente mediante análisis Camag.

La justificación, la fundamentación y la interpretación de las técnicas de detección mencionadas anteriormente son conocidas por el experto en la materia. Brevemente, la puntuación de Rann determina la intensidad de la línea en una escala de cuantificación que varía de 0 a 10 unidades en comparación con una tarjeta de referencia bien definida y el análisis de Camag determina la intensidad de la línea escaneando las tiras de arriba hacia abajo y realizando así un análisis densitométrico en una escala de 0 a 1000 unidades.

En el caso de que la muestra biológica, preferentemente una muestra de sangre entera, no contenga ADA contra el fármaco biológico, no aparecerá ninguna banda roja en la, como mínimo, una línea de prueba como resultado de la falta de formación de immunocomplejos de fármaco-ADA en la almohadilla de conjugado y la falta de reacción posterior con el fármaco biológico inmovilizado en la tira de la membrana en el área de captura. Si la, como mínimo, una línea de control opcional existe en el dispositivo, una banda roja será visualmente distinguible en la por lo menos una línea de control como consecuencia de la reacción entre las moléculas de control IgY de pollo conjugados con partículas coloidales de oro y los anticuerpos contra IgY de pollo inmovilizados en la tira de la membrana en el área de captura.

Si la, como mínimo, una línea de control está presente y no da ninguna señal, el resultado del inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención no será válido.

En otra realización, la presente invención se refiere a un dispositivo para llevar a cabo el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención que comprende:

- una membrana de inmunoensayo de flujo lateral tal como se ha descrito anteriormente; y
- un envase.

El envase puede estar hecho de cualquier material conocido en el estado de la técnica que permita la protección de la membrana utilizada para llevar a cabo el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención. Preferentemente, el envase está hecho de plástico.

Además, se hace hincapié en que el recipiente tiene una estructura que permite la aplicación de la muestra y la visualización de los resultados de la prueba sin quitar dicho envase.

En una realización preferente, el dispositivo de la presente invención es un dispositivo de un único uso.

En una realización adicional, el dispositivo de la presente invención comprende también una lanceta y un componente para la recogida de sangre.

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención que comprende:

- un dispositivo tal como se ha descrito anteriormente; y
- instrucciones para realizar el ensayo.

En otra realización, la presente invención se refiere a la utilización de los inmunoensayos de flujo lateral de la presente invención y, por ende, de los dispositivos y equipos que comprenden dichos inmunoensayos de flujo lateral o que permiten llevarlos a cabo, para detectar ADA contra un fármaco biológico en una muestra biológica de un paciente. La presencia de ADA en la muestra biológica de un paciente indicaría o predeciría que es de esperar una pérdida o reducción de la efectividad del fármaco si dicho fármaco se vuelve a administrar al paciente.

La muestra biológica utilizada puede ser sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial, saliva, fluido ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, semen, fluido vaginal, líquido amniótico o similares. En una realización preferente, la muestra biológica utilizada es sangre entera, plasma o suero, más preferentemente sangre entera.

Como se ha mencionado anteriormente, en la realización más preferente de la presente invención, el uso del inmunoensayo de flujo lateral permite la detección de la presencia o ausencia de ADA contra IFX en una muestra biológica de un paciente. La presencia de ADA contra IFX en dicha muestra biológica del paciente indica o predice que una pérdida o reducción de la eficacia del IFX es de esperar si se administra IFX adicional al paciente.

En otra realización preferente, el uso del inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención mencionado anteriormente se realiza para medir los niveles mínimos de ADA en el paciente. Por esta razón, la medición de los niveles se realiza dentro de las 72 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, preferentemente dentro de las 48 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, más preferentemente dentro de las 24 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico y aún más preferentemente justo antes de la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico. Por lo tanto, en la realización preferente se miden los niveles mínimos de ADA contra el fármaco biológico.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de modulación de un tratamiento con fármaco biológico administrado a un paciente que precisa del mismo, que comprende las etapas de:

a) una primera etapa de obtención de una muestra biológica del paciente;
b) una segunda etapa de analizar la muestra biológica utilizando un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente configurado para detectar ADA contra dicho fármaco biológico; y
c) una tercera etapa de modulación de la siguiente dosis de fármaco biológico que se ha de administrar al paciente sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa b).

La muestra biológica utilizada puede ser sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial, saliva, fluido ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, semen, fluido vaginal, líquido amniótico o similares. En una realización preferente, la muestra biológica utilizada es sangre entera, plasma o suero, más preferentemente sangre entera.

En una realización preferente, la etapa c) comprende mantener la dosis de fármaco biológico en caso de que el resultado del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) sea negativo. En otra realización preferente, la etapa c) comprende incrementar la dosis de fármaco biológico en caso de que el resultado del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) sea positivo.

En una realización preferente adicional, la etapa c) comprende detener la administración de fármaco biológico en caso de que el resultado del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) sea positivo.

Se contempla que la muestra biológica para la primera etapa se obtenga dentro de las 72 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, preferentemente dentro de las 48 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, más preferentemente dentro de las 24 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico y aún más preferentemente justo antes de la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico. En la realización más preferente, en la etapa b) el método mide los niveles mínimos de ADA contra el fármaco biológico en el paciente.

En otra realización preferente, el paciente tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria y está siendo tratado con un fármaco biológico, más preferentemente, el paciente tiene psoriasis, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide o colitis ulcerosa y está siendo tratado con un fármaco biológico.

En la realización más preferente, el fármaco biológico es IFX.

Además, en otra realización, la presente invención también se refiere a un método de predecir si un paciente responderá o no a un tratamiento con un fármaco biológico o una dosis adicional de un tratamiento con un fármaco biológico que comprende las etapas de:

a) una primera etapa de obtención de una muestra biológica del paciente;
b) una segunda etapa de analizar la muestra biológica utilizando un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente, configurado para detectar ADA contra dicho fármaco biológico; y
c) una tercera etapa de determinar si un paciente responderá o no a un tratamiento con un fármaco biológico o una dosis adicional de un tratamiento con un fármaco biológico sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa b).

La muestra biológica utilizada puede ser sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial, saliva, fluido ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, semen, fluido vaginal, líquido amniótico o similares. En un realización preferente, la muestra biológica utilizada es sangre entera, plasma o suero, más preferentemente sangre entera.

Un resultado negativo del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) significa que el paciente es susceptible de responder a un tratamiento con el fármaco biológico o a una dosis adicional de dicho fármaco biológico.

Un resultado positivo del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) significa que el paciente es susceptible de no responder a un tratamiento con el fármaco biológico o a una dosis adicional de dicho fármaco biológico.

Se contempla que la muestra biológica para la primera etapa se obtenga dentro de las 72 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, preferentemente dentro de las 48 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, más preferentemente dentro de las 24 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico y aún más preferentemente justo antes de la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico. En la realización más preferente, en la etapa b) el método mide los niveles mínimos de ADA contra el fármaco biológico en el paciente.

En otra realización preferente, el paciente tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria y está siendo tratado con un fármaco biológico, más preferentemente, el paciente tiene psoriasis, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide o colitis ulcerosa y está siendo tratado con un fármaco biológico.

En la realización más preferente, el fármaco biológico es IFX.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para determinar si un paciente debe recibir una dosis adicional de un fármaco biológico que comprende las etapas de:

a) una primera etapa de obtención de una muestra biológica del paciente;
b) una segunda etapa de analizar la muestra biológica utilizando un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente, configurado para detectar ADA contra dicho fármaco biológico; y
c) una tercera etapa de determinar si el paciente recibe una dosis adicional de fármaco biológico sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa b)

La muestra biológica utilizada puede ser sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial, saliva, fluido ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, semen, fluido vaginal, líquido amniótico o similares. En un realización preferente, la muestra biológica utilizada es sangre entera, plasma o suero, más preferentemente sangre entera.

Un resultado negativo del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) significa que se debe administrar al paciente una dosis adicional de dicho fármaco biológico.

Un resultado positivo del inmunoensayo de flujo lateral realizado en la etapa b) significa que no debe administrarse al paciente una dosis adicional de dicho fármaco biológico.

Se contempla que la muestra biológica para la primera etapa se obtenga dentro de las 72 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, preferentemente dentro de las 48 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico, más preferentemente dentro de las 24 horas anteriores a la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico y aún más preferentemente justo antes de la infusión de la siguiente dosis del fármaco biológico. En la realización más preferente, en la etapa b) el método mide los niveles mínimos de ADA contra el fármaco biológico en el paciente.

En otra realización preferente, el paciente tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria y está siendo tratado con un fármaco biológico, más preferentemente, el paciente tiene psoriasis, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide o colitis ulcerosa y está siendo tratado con un fármaco biológico.

En la realización más preferente, el fármaco biológico es IFX.

Por lo tanto, los inmunoensayos de flujo lateral y ensayos de inmunocromatografía descritos anteriormente tienen un formato de unión puente, en el cual los ADA, si están presentes en la muestra del paciente, actúan de puente que une el fármaco biológico marcado de forma detectable presente en el área de conjugado y el fármaco biológico inmovilizado en el área de captura. Además, sorprendentemente, este tipo de estructura se obtiene sin la necesidad de tratamientos previos o incubaciones de la muestra, sólo mediante la aplicación de la muestra en una membrana o tira de prueba con la estructura descrita en el presente documento. Además, dicha estructura de puente, sorprendentemente, puede formarse de manera eficaz en un lapso de tiempo corto, es decir de 5 a 60 minutos, un marco de tiempo más corto que el descrito en el estado de la técnica.

Por lo tanto, la principal ventaja de los ensayos de la presente invención es que la estructura del ensayo propuesto no necesita ninguna manipulación específica o reacción de la muestra obtenida con los reactivos antes de ser aplicada a la tira. Por lo tanto, permite la obtención de resultados en un marco de tiempo muy corto (5 a 60 minutos). Estas características permiten el uso de los ensayos descritos en el presente documento para tomar decisiones sobre la administración de la siguiente dosis de un fármaco biológico a un paciente sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo.

Además, la configuración de la prueba o ensayo proporciona un dispositivo pequeño, portátil, simple, rápido, fácil de usar y rentable que no necesita de un operador calificado, ni equipo adicional para obtener información cualitativa sobre si un paciente tiene ADA que puede utilizarse para la toma decisiones clínicas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para la detección de ADA contra IFX.

En este caso, el uso del ensayo estaba destinado a detectar ADA contra IFX. Por lo tanto, el fármaco biológico depositado en la almohadilla de conjugado e inmovilizado en el área de captura fue infliximab. El fármaco infliximab se obtuvo como polvo liofilizado para concentrado de perfusión, reconstituido en agua a una concentración de 10 mg/ml y el 0,05% de azida sódica e inmovilizado en las tiras de nitrocelulosa. Para llevar a cabo esta inmovilización, IFX se diluyó en tampón de inmovilización BBS a una concentración de 1 mg/ml y tarjetas laminadas con tiras de nitrocelulosa MDI® 8 µ SN12 se laminaron para producir una línea de ensayo con la solución de IFX mencionada anteriormente utilizando una máquina de isoflujo de mesa ("bench-top iso-flow machine") (1 µl por tira).

Se generó una línea de control para detectar IgY de pollo conjugada en el área de captura con la inmovilización de una solución de 0,5 mg/ml de anticuerpos IgY anti-pollo utilizando una máquina de isoflujo de mesa ("bench-top iso-flow machine") (1 µl por tira).

Una vez recubiertas, la nitrocelulosa se colocó inmediatamente en un horno de secado a 37ºC para incubación durante la noche (durante 16-24 horas) para asegurar que IFX se inmoviliza en la nitrocelulosa.

El mismo stock del fármaco infliximab en solución se usó para la conjugación con partículas coloidales de oro de 40 nm de diámetro. Además, se conjugó IgY de pollo con partículas coloidales de oro de 20 nm de diámetro.

Después de la conjugación, ambos conjugados de IFX y IgY de pollo se depositaron en la almohadilla de conjugado de poliéster dispuesta en una tira de nitrocelulosa mediante la pulverización con el isoflujo de mesa ("bench-top iso-flow") con un cabezal de atomización a presión, a una velocidad de pulverización calculada para aplicar 40 Unidades de Oro de IFX y 15 Unidades de Oro de IgY de pollo por tira de prueba. Las tiras pulverizadas se dejaron secar durante 20 minutos a 37ºC.

En el inmunoensayo de flujo lateral probado, la almohadilla de separación de sangre fue MDI® FR-1 0,6 almohadilla de separación de sangre (MDI®, India). Además, una almohadilla absorbente distal de papel de Ahlstrom® (código de producto 222) (Ahlstrom®, Finland) se colocó en posición distal a la membrana para ayudar a que la muestra fluyera a través de la membrana.

En primer lugar, se ensayaron una muestra de suero humano de un individuo sano y una muestra positiva de suero obtenida de un paciente tratado con IFX que contenía 753 U/ml (determinado con un kit de ELISA Promonitor® anti-IFX) (1 unidad/ml corresponde a 10 ng/ml de anticuerpos IgG) de ADA contra IFX. En ambos casos se utilizaron 20 ml de serum de las muestras. Tras 30 segundos de la aplicación de la muestra, se añadió 100 ml de tampón PBS (0,01 M tampón fosfato, 0,0027 M cloruro de potasio y 0,137 M cloruro de sodio, pH 7,4) La muestra se movió a través del área de aplicación de muestra, la almohadilla de conjugado y a través de la tira de nitrocelulosa hasta el área de captura. Se dejó que el ensayo o prueba se desarrollase o reaccionase durante 30 minutos y luego se analizó visualmente. La figura 3 muestra los resultados obtenidos. En la figura 3A puede verse que el suero derivado de un individuo sano sólo produjo una señal visual en la línea de control (línea roja en la parte superior de la tira). Por el contrario, en la figura 3B se aprecia que el suero positivo mencionado anteriormente produjo señal visual tanto en la línea de control como en la línea de prueba, es decir, dos líneas rojas, una en la parte superior de la tira y otra en la parte inferior (líneas de control y de prueba, respectivamente), mostrando la presencia de ADA contra IFX.

También se probaron muestras de sangre con la prueba o ensayo mencionados anteriormente. Se utilizó sangre entera de una muestra negativa y una muestra positiva generada dopando sangre entera negativa con suero que contenía 241 U/ml de ADA contra IFX (determinada con un kit de ELISA Promonitor® anti-IFX) (1 unidad/ml corresponde a 10 ng/ml de anticuerpos IgG). Para el mencionado dopaje, se centrifugó un volumen de 500 µl de sangre entera (1500 rpm; 10 minutes) y el sobrenadante (160 ml) fue reemplazado por un volumen igual de suero que contenía 241 U/ml de ADA contra IFX. Se utilizaron 40 ml de sangre entera de una muestra negativa y una muestra positiva dopada.

Tras 30 segundos de la aplicación de muestra, se añadieron 100 ml de tampón PBS (composición mencionada anteriormente). La muestra se movió a través del área de aplicación de muestra, la almohadilla de conjugado y a través de la tira de nitrocelulosa hasta el área de captura. Se dejó que el ensayo o prueba se desarrollase o reaccionase durante 30 minutos y luego se analizó visualmente. La figura 4 muestra los resultados obtenidos. En la figura 4A se aprecia que la muestra negativa de sangre entera produce una señal visual en la línea de control (línea roja en la parte superior de la tira). Por el contrario, en la Figura 4B se aprecia que la muestra positiva mencionada anteriormente produjo señal visual tanto en la línea de control como en la línea de prueba, es decir, dos líneas rojas,

una en la parte superior de la tira y otra en la parte inferior (líneas de control y de prueba, respectivamente), mostrando la presencia de ADA contra IFX.

Ejemplo 2. Sensibilidad del dispositivo de flujo lateral en muestras de suero

La sensibilidad de un inmunoensayo de flujo lateral tal como se ha explicado en el ejemplo 1 se determinó analizando una muestra de suero positiva para anticuerpos contra infliximab en diluciones seriadas (véase figura 5). Una muestra de suero que contenía 506 U/ml de ADA contra IFX (determinada con un kit de ELISA Promonitor® anti-IFX) se diluyó 1:1 de manera seriada en otra muestra de suero negativa para obtener niveles decrecientes de ADA de 506 U/ml a 16 U/ml. También se analizó la muestra de suero negativa como control negativo del experimento. Después de la preparación de muestras, se agregaron 20 µl de cada muestra de suero al área de aplicación de muestra de cada dispositivo utilizando una micropipeta. Después de 30 segundos, se agregaron 100 µl de tampón de arrastre PBS a cada dispositivo y se dejaron en la poyata a temperatura ambiente durante 30 minutos. De todas las muestras se hizo triplicado.

Los resultados se analizaron siguiendo dos métodos de interpretación diferentes. En primer lugar, se realizó un análisis visual de las tiras puntuando las intensidades de línea en una escala de 0 a 10 unidades utilizando una tarjeta de comparación (puntuación Rann). En segundo lugar, se leyeron las tiras utilizando un escáner específico y se cuantificaron las intensidades de línea en una escala numérica de 0 a 1.000 unidades (análisis Camag). Los resultados aparecen resumidos en la figura 5. El análisis de dichos resultados reveló una disminución de la intensidad de señal en la línea de prueba (parte inferior de la tira reactiva) a lo largo de la serie de diluciones preparada, tanto en la puntuación Rann visual como en la puntuación Camag. Si se define un valor umbral para la positividad de 2 unidades en la puntuación de Rann y 50 unidades en la puntuación Camag, 32 U/ml de anticuerpos contra infliximab se detectan bien por encima de esos valores umbral (figuras 5B, 5C). En este experimento, el límite de detección del inmunoensayo de flujo lateral fue entre 16 U/ml y 32 U/ml para el análisis visual y 16 U/ml cuando el inmunoensayo de flujo lateral se leyó utilizando un escáner.

Ejemplo 3. Sensibilidad del dispositivo de flujo lateral en muestras de sangre

La sensibilidad de un inmunoensayo de flujo lateral tal como se ha explicado en el ejemplo 1 se determinó analizando una muestra de sangre dopada con un suero positivo que contenía 384 U/ml de ADA contra IFX (determinado con un kit de ELISA Promonitor® anti-IFX) (véase figura 6), y diluida 1:1 de manera seriada en una muestra de sangre negativa para obtener niveles decrecientes de ADA de 384 U/ml a 12 U/ml. También se analizó la muestra de sangre negativa como control negativo del experimento. La misma dilución seriada se realizó con suero y el suero negativo. Después de la preparación de muestras, se agregaron 15 µl de cada suero y 30 µl de cada muestra de sangre al área de aplicación de muestra de cada dispositivo utilizando una micropipeta. Después de 30 segundos, se agregaron 100 µl de tampón de arrastre PBS a cada dispositivo y se dejaron en la poyata a temperatura ambiente durante 30 minutos. De las muestras de sangre dopada y sangre negativa se hizo triplicado y de las muestras de suero se hicieron cinco réplicas.

Los resultados se analizaron siguiendo dos métodos de interpretación diferentes. En primer lugar, se realizó un análisis visual de las tiras puntuando las intensidades de línea en una escala de 0 a 10 unidades utilizando una tarjeta de comparación (puntuación Rann). En segundo lugar, se leyeron las tiras utilizando un escáner específico y se cuantificaron las intensidades de línea en una escala numérica de 0 a 1000 unidades (análisis Camag). Los resultados aparecen resumidos en la figura 6. El análisis de los resultados reveló una clara intensidad de señal por encima de los valores umbral tanto en la puntuación Rann visual como en la puntuación Camag, establecidos en 2 unidades y 50 unidades, respectivamente (Figuras 6B, 6C). El límite de detección del inmunoensayo de flujo lateral fue 12 U/ml para el análisis visual y con escáner tanto para muestras de suero como de sangre.

REIVINDICACIONES

1. Inmunoensayo de flujo lateral para la detección de anticuerpos anti-fármaco contra un fármaco biológico que comprende: una membrana que comprende:

- un área de captura;
- un área de aplicación de muestra;
- una trayectoria de flujo del área de aplicación de muestra al área de captura; y
- un área de conjugado situada en la trayectoria de flujo, **caracterizado por que** el área de conjugado comprende dicho fármaco biológico marcado de forma detectable y el área captura comprende dicho fármaco biológico inmovilizado.

2. Inmunoensayo de flujo lateral, según reivindicación 1, **caracterizado por que** el fármaco biológico es infliximab.

3. Inmunoensayo de flujo lateral, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado por que** el área de conjugado comprende una almohadilla de conjugado.

4. Inmunoensayo de flujo lateral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la membrana es una membrana de nitrocelulosa.

5. Inmunoensayo de flujo lateral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el fármaco biológico comprendido en el área de conjugado está marcado de forma detectable con partículas coloidales de oro.

6. Inmunoensayo de flujo lateral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el área de aplicación de muestra comprende una almohadilla de separación de sangre.

7. Inmunoensayo de flujo lateral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** además comprende una almohadilla absorbente distal.

8. Dispositivo que comprende:

- una membrana de inmunoensayo de flujo lateral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
- un envase.

9. Kit que comprende:

- un dispositivo según la reivindicación 8; e
- instrucciones para llevar a cabo el ensayo.

10. Uso de un inmunoensayo de flujo lateral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para detectar anticuerpos anti-fármaco contra un fármaco biológico en una muestra biológica de un paciente.

11. Método de modulación de un tratamiento con fármaco biológico administrado a un paciente que precisa del mismo, que comprende las etapas de:

a) una primera etapa de analizar la muestra biológica utilizando un inmunoensayo de flujo lateral según cualquiera de Las reivindicaciones 1 a 7 configurado para detectar anticuerpos anti-fármaco contra dicho fármaco biológico; y
b) una segunda etapa de modulación de la siguiente dosis de fármaco biológico que se ha de administrar al paciente sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa a).

12. Método de predecir si un paciente responderá o no a un tratamiento con un fármaco biológico o una dosis adicional de un tratamiento con un fármaco biológico que comprende las etapas de:

a) una primera etapa de analizar la muestra biológica utilizando un inmunoensayo de flujo lateral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 configurado para detectar anticuerpos anti-fármaco contra dicho fármaco biológico; y
b) una segunda etapa de determinar si un paciente responderá o no a un tratamiento con un fármaco biológico o una dosis adicional de un tratamiento con un fármaco biológico sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa a).

13. Método para determinar si un paciente debe recibir una dosis adicional de un fármaco biológico que comprende las etapas de:

a) una primera etapa de analizar la muestra biológica utilizando un inmunoensayo de flujo lateral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 configurado para detectar anticuerpos anti-fármaco contra dicho fármaco biológico; y
b) una segunda etapa de determinar si el paciente recibe una dosis adicional de fármaco biológico sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa a).

14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado por que** la muestra biológica es sangre entera o suero.

15. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado por que** en la etapa a) el método mide los niveles mínimos de los anticuerpos anti-fármaco contra el fármaco biológico.

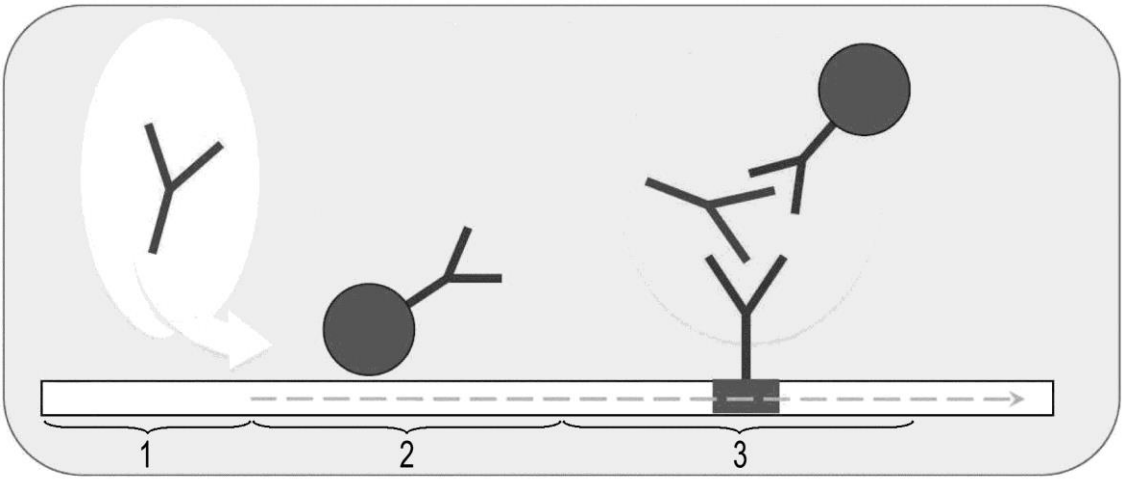


FIG. 1

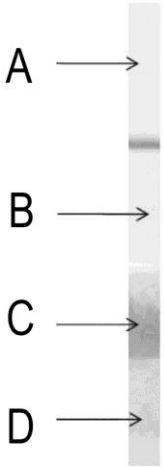
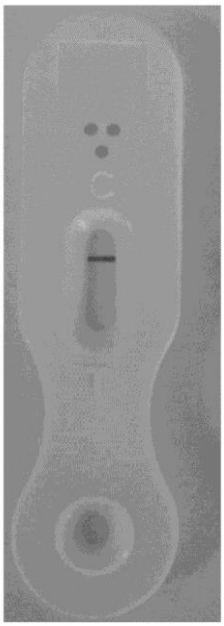


FIG. 2

(A)



(B)

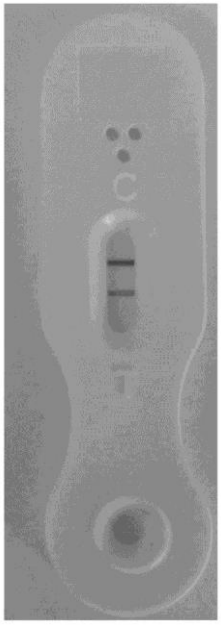
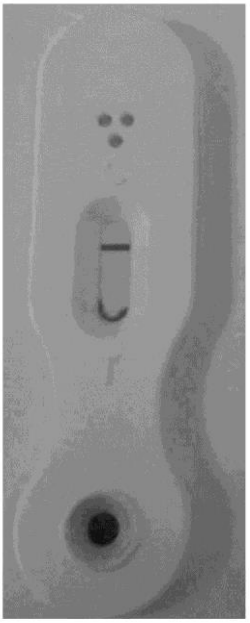


FIG. 3

(A)



(B)

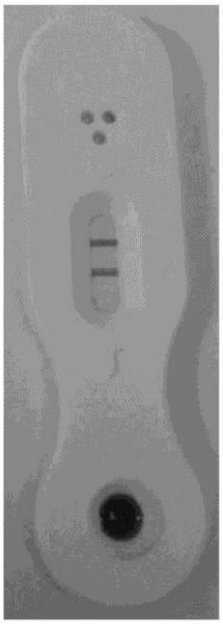


FIG. 4

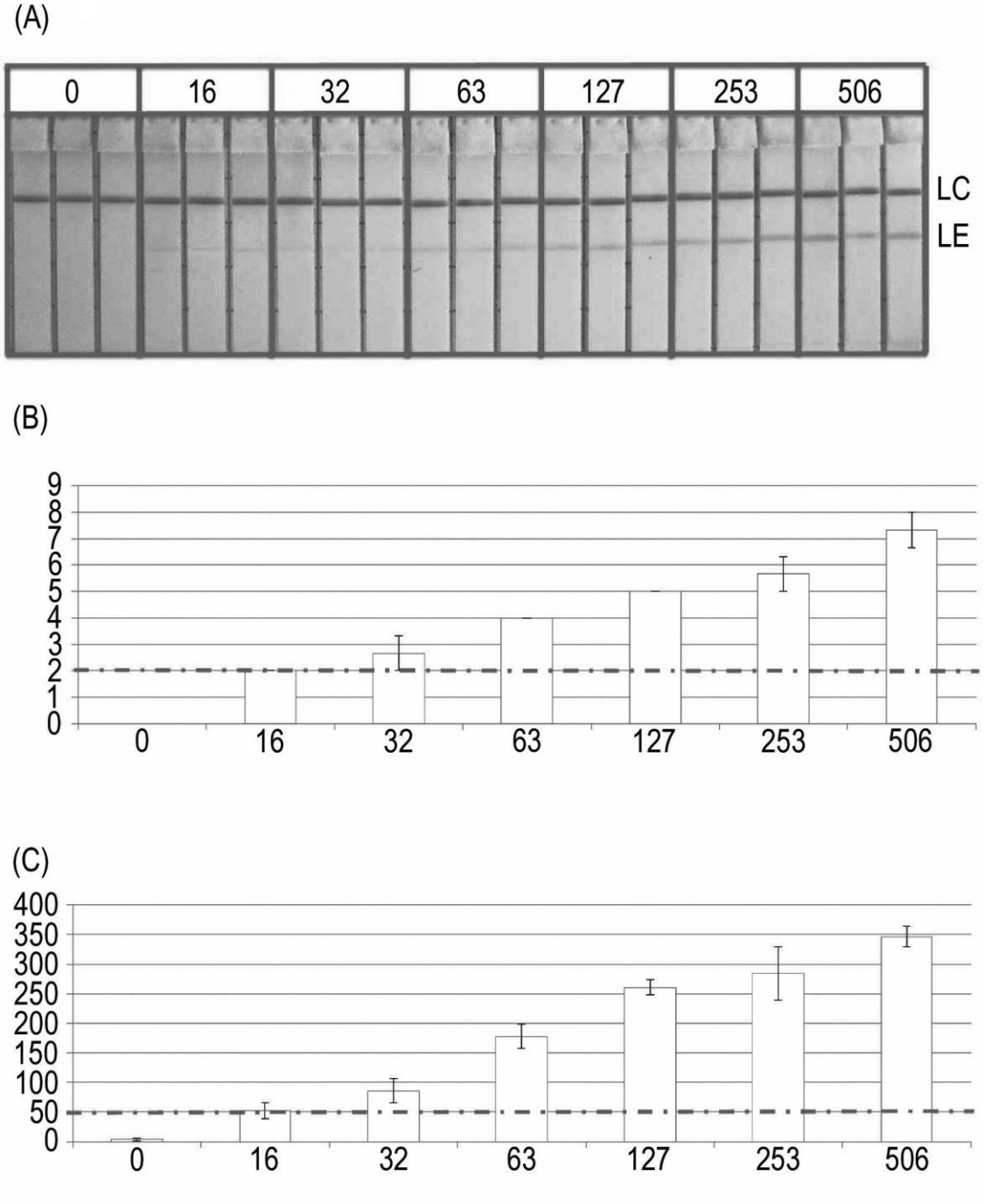
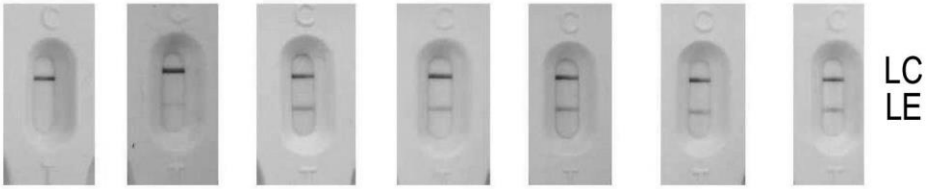
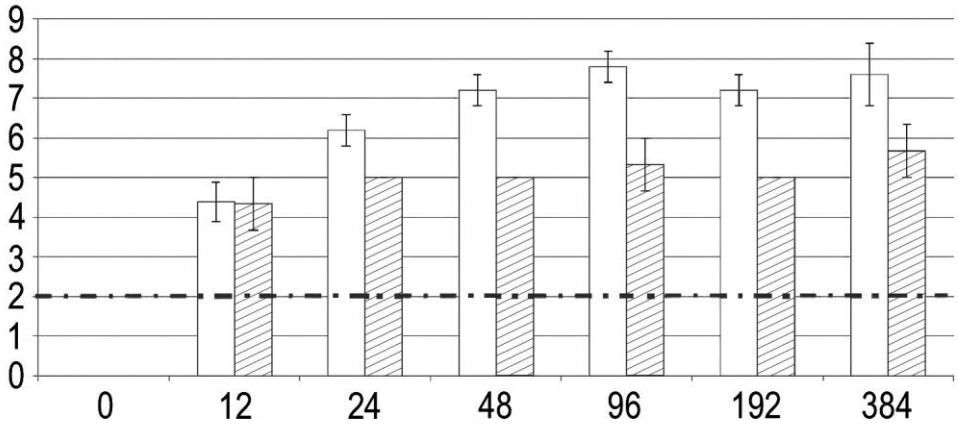

(A)
0
16
32
63
127
253
506
LC
LE
(B)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
16
32
63
127
253
506
(C)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
16
32
63
127
253
506

FIG. 5

(A)


LC
LE

(B)


9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
12
24
48
96
192
384

(C)

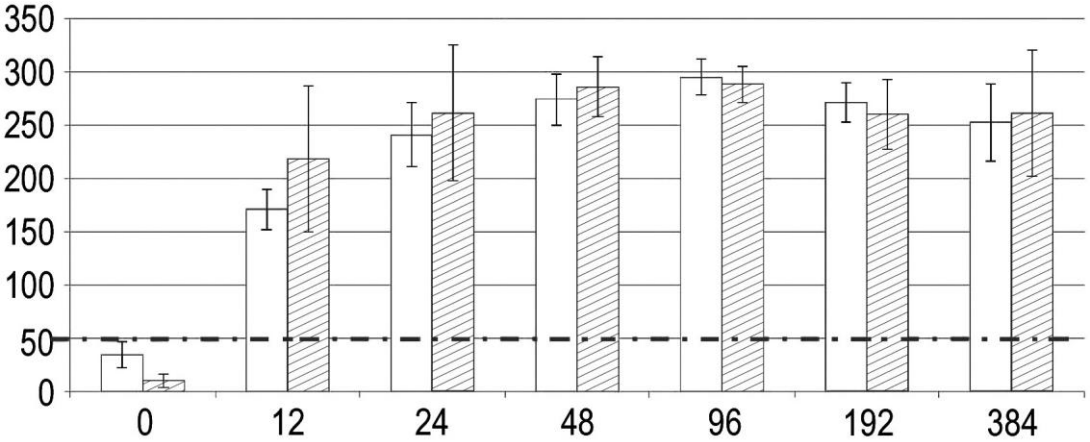

350
300
250
200
150
100
50
0
0
12
24
48
96
192
384

FIG. 6