

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 085**

51 Int. Cl.:

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2015 PCT/IB2015/059381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16088104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2015 E 15816881 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3227683**

54 Título: **Ensayos de cambio de movilidad homogéneos indirectos para la detección de agentes biológicos en muestras de pacientes**

30 Prioridad:

05.12.2014 US 201462088465 P

06.02.2015 US 201562113317 P

08.05.2015 US 201562158791 P

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

16.12.2019

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)

Entre-deux-Villes

1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

SALBATO, JARED;

WESTIN, STEFAN;

CHI-KWAN LING, NICHOLAS;

JAIN, ANJALI y

SINGH, SHARAT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 735 085 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayos de cambio de movilidad homogéneos indirectos para la detección de agentes biológicos en muestras de pacientes

5

Antecedentes de la invención

Enfermedad inflamatoria del intestino (EII), que se produce en todo el mundo y afecta a millones de personas, es el término empleado para describir tres trastornos gastrointestinales de etiología desconocida: enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) y colitis indeterminada (CI). La EII, junto con el síndrome del intestino irritable (SII), afectará a la mitad de la población estadounidense a lo largo de su vida, con un coste superior a los 2.600 millones de dólares para la EII y de más de 8.000 millones de dólares para el SII. Un determinante principal de estos altos costes médicos es la dificultad de diagnosticar enfermedades digestivas y cómo progresarán estas enfermedades. El coste de la EII y el SII se ve incrementado por la pérdida de productividad, las personas que padecen estos trastornos pierden al menos 8 días más de trabajo anualmente que la media nacional.

A pesar de los éxitos de las terapias anti-TNF α en el tratamiento de la EII, una subpoblación de pacientes es resistente al tratamiento, destacando una necesidad médica no satisfecha de nuevas terapias. Vedolizumab es un anticuerpo monoclonal neutralizante de la integrina $\alpha 4\beta 7$, que no afecta a los recuentos de células de sangre periférica y que parece carecer de efectos sistémicos. Vedolizumab es una nueva opción de tratamiento antiinflamatorio para el tratamiento de pacientes resistentes al tratamiento. Además, ustekinumab es un anticuerpo monoclonal contra IL12p40, que es otro nuevo agente terapéutico contra la EII. Sin embargo, se hace necesario tener disponibles pruebas diagnósticas para medir con precisión los niveles de agentes biológicos, tales como vedolizumab y ustekinumab para un uso eficaz de estos nuevos agentes terapéuticos en pacientes con EII.

25

Como tal, existe una necesidad en la técnica de ensayos para detectar la presencia o el nivel de productos biológicos, tales como vedolizumab y ustekinumab en una muestra de paciente para monitorizar la terapia farmacológica y para guiar las decisiones de tratamiento. Dichos ensayos son particularmente útiles para el manejo terapéutico de enfermedades tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn usando un enfoque individualizado para monitorizar la eficacia del fármaco y optimizar la terapia en consecuencia y pueden incluir la evaluación del curso de la enfermedad y de parámetros clínicos, tales como la farmacodinámica, los índices de actividad de la enfermedad, la carga de enfermedad y los biomarcadores inflamatorios. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona nuevos ensayos de cambio de movilidad homogéneos indirectos para detectar y medir la presencia o nivel de un agente biológico en una muestra. Los ensayos de la presente invención son particularmente ventajosos para detectar y medir la presencia o el nivel de agentes biológicos que se dirigen a antígenos complejos, incluyendo proteínas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas altamente glucosiladas, proteínas multiméricas y similares. Como tal, la presente invención proporciona información para guiar las decisiones de tratamiento para aquellos sujetos que reciben terapia con un agente biológico y mejora la precisión de la optimización terapéutica, reduce la toxicidad y/o monitoriza la eficacia del tratamiento terapéutico con la terapia biológica. La presente invención también proporciona heterodímeros de integrina $\alpha 4\beta 7$ solubles aislados y monómeros de IL-12p40 solubles aislados que son adecuados para su uso en los ensayos descritos en el presente documento.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un método para determinar la presencia o el nivel de un agente biológico en una muestra, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto la muestra con un antígeno soluble no marcado que se une al agente biológico para formar un complejo no marcado entre el antígeno y el agente biológico en la muestra;
- (b) poner en contacto la muestra de la etapa (a) con una forma marcada del agente biológico para formar un complejo marcado entre el antígeno y el agente biológico marcado;
- (c) someter los complejos marcados y no marcados a cromatografía de exclusión por tamaños para separar los complejos marcados y no marcados de los agentes biológicos marcados libres y para detectar una cantidad del agente biológico marcado libre; y
- (d) comparar la cantidad del agente biológico marcado libre detectado en la etapa (c) con una curva patrón de cantidades conocidas del agente biológico, determinando de este modo la presencia o nivel del agente biológico en la muestra.

60

En algunas realizaciones, el agente biológico incluye anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, proteínas de unión multivalentes, conjugados de anticuerpo y fármaco, vacunas, ácidos nucleicos, azúcares, formas recombinantes de los mismos, formas modificadas por ingeniería genética de los mismos y combinaciones de los mismos.

65

En determinadas realizaciones, el antígeno es una versión soluble (por ejemplo, un fragmento soluble, variante o forma

- monomérica) de una proteína unida a membrana, una proteína glucosilada, una proteína multimérica, una proteína insoluble, una proteína que es difícil de expresar o purificar y/o una proteína grande. En ciertos casos, el antígeno es un dominio extracelular soluble de una proteína unida a membrana (por ejemplo, un dominio extracelular de receptor de citocina soluble). En ciertos casos diferentes, el antígeno es un homodímero o heterodímero soluble que comprende los dominios extracelulares de dos proteínas unidas a la membrana (por ejemplo, un heterodímero de integrina soluble). En otros casos más, el antígeno es una proteína soluble que no se multimeriza y permanece en forma monomérica una vez aislado y/o purificado (por ejemplo, una variante de citocina soluble con uno o más restos de cisteína mutados para minimizar o eliminar la formación de multímeros).
- En otras realizaciones, la muestra es una muestra de sangre entera, suero o plasma, por ejemplo, de un sujeto que recibe terapia biológica. En realizaciones preferidas, la muestra es suero. En realizaciones particulares, el sujeto tiene una enfermedad o trastorno, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), tal como enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU)) o cáncer.
- En realizaciones particulares, la curva patrón se genera incubando el antígeno y el agente biológico marcado con una dilución en serie (por ejemplo, de factor dos) de cantidades conocidas del agente biológico. En determinadas realizaciones, el área bajo la curva (ABC) del agente biológico marcado libre se representa contra (por ejemplo, el logaritmo de) cantidades conocidas del agente biológico obtenidas de la curva patrón y se calcula por interpolación el nivel del agente biológico en la muestra, por ejemplo, basándose en el tamaño del área del pico del agente biológico libre marcado. En otras realizaciones, el marcador libre agregado a una solución madre de agente biológico marcado se usa como control de carga de agente biológico marcado. La relación entre el agente biológico marcado libre y el marcador libre se representa frente a las cantidades conocidas de agente biológico.
- En una realización particular, la presencia y/o el nivel de un fármaco de anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, vedolizumab) se determina con un ensayo de desplazamiento de movilidad homogéneo indirecto usando cromatografía de exclusión por tamaños como se describe en el presente documento.
- En otra realización particular, la presencia y/o el nivel de un fármaco anti-IL12p40 (por ejemplo, ustekinumab) se determina con un ensayo de desplazamiento de movilidad homogéneo indirecto usando cromatografía de exclusión por tamaños como se describe en el presente documento.
- En otras realizaciones, se determina la presencia y/o el nivel de anticuerpos anti-fármaco (ADA) (por ejemplo, autoanticuerpos que incluyen HACA, HAHA, etc.) que se generan contra fármacos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ y anti-fármacos de IL 12p40, así como otros agentes biológicos, con un ensayo de cambio de movilidad homogéneo, como se describe en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 8.574.855 y 8.865.417 y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 2014/0051184 y 2014/0141983.
- En otros aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. En otros aspectos más, la presente invención proporciona un polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
- En realizaciones particulares, la presente descripción proporciona un heterodímero de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble aislado que comprende:
- (a) un polipéptido de integrina $\alpha 4$ que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido de integrina $\alpha 4$ está unido a un primer miembro de un par de unión (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) y
 - (b) un polipéptido de integrina $\beta 7$ que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido de integrina $\beta 7$ está unido a un segundo miembro del par de unión (por ejemplo, la SEQ ID NO: 4).
- En otros aspectos concretos, la presente descripción proporciona un polipéptido de IL-12p40 soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12 o 13.
- En realizaciones particulares, el antígeno soluble no marcado utilizado en los ensayos de desplazamiento de movilidad homogéneos indirectos de la presente invención comprende los heterodímeros de integrina $\alpha 4\beta 7$ solubles aislados o los polipéptidos IL-12p40 solubles aislados descritos en el presente documento.
- En aspectos adicionales, la presente descripción proporciona vectores de expresión que codifican los polipéptidos solubles descritos en el presente documento, células hospedadoras que comprenden los vectores de expresión y métodos para generar los polipéptidos solubles descritos en el presente documento.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras.

Breve descripción de los dibujos

5 La **FIG. 1** muestra el principio de los ensayos de desplazamiento de movilidad homogéneos indirectos (HMSA) de la presente invención. Usando vedolizumab ("VLM" o "Vedo") como ejemplo no limitativo, en la primera etapa, se añade suero a una placa de 96 pocillos junto con la integrina $\alpha 4\beta 7$ y tampón diluyente. En la segunda etapa, se añade VLM marcado (por ejemplo, Vedo Alexa 488). Después, se inyectan las muestras secuencialmente en una columna HPLC de exclusión por tamaños.

10 La **FIG. 2** muestra los cromatogramas de Vedo Alexa 488 (izquierda) y Vedo Alexa 488 más antígeno de integrina $\alpha 4\beta 7$ (derecha) con tiempos de retención (eje x) y unidades de luz (eje y) de una realización de la presente invención. Ambos están en 4 % de suero humano normal. Obsérvese que el antígeno se une a la mayoría de los VLM marcados.

15 La **FIG. 3** muestra los cromatogramas de superposiciones de curva patrón con el tiempo de retención (eje x) y las unidades de luz (eje y) de los diversos componentes de un ensayo VLM en una realización de la presente invención. "Vedo Alexa 488/ $\alpha 4\beta 7$ " = VLM marcado con Alexa Fluor® 488 unido a un heterodímero de $\alpha 4\beta 7$ soluble. "Alexa 488" = Control de carga de Alexa Fluor® 488 bloqueado (por ejemplo, inactivado). Obsérvese que el pico de área de Vedo Alexa 488 aumenta de tamaño cuando hay más VLM terapéutico presente.

20 La **FIG. 4** muestra una curva patrón de VLM en una realización de la presente invención. La curva patrón se generó usando una dilución en serie de VLM con un intervalo de concentración de entre 0,15625 $\mu\text{g/ml}$ y 80 $\mu\text{g/ml}$.

25 La **FIG. 5** muestra una validación de ensayo de fármaco VLM en una realización de la presente invención. El límite de blanco (LOB), límite de detección (LOD), el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ) se calcularon usando una curva patrón generada a partir de una dilución en serie de VLM con un intervalo de concentración de entre 0,15625 $\mu\text{g/ml}$ y 80 $\mu\text{g/ml}$.

30 La **FIG. 6** muestra la precisión y la exactitud intraensayo del ensayo de fármaco VLM en una realización de la presente invención.

35 La **FIG. 7** muestra el tiempo de retención (eje x) y las unidades de luz (eje y) de un ensayo de autoanticuerpos anti-vedolizumab (ATV) en una realización de la presente invención.

La **FIG. 8** muestra la validación del ensayo de ATV en una realización de la presente invención.

40 La **FIG. 9** muestra la validación del ensayo de ATV en una realización de la presente invención.

La **FIG. 10** muestra la precisión interensayo del ensayo ATV en una realización de la presente invención.

45 La **FIG. 11** muestra una validación de ensayo de fármaco ustekinumab (UTK) en una realización de la presente invención. El límite de blanco (LOB), límite de detección (LOD), el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ) se calcularon usando una curva patrón generada a partir de una dilución en serie de UTK con un intervalo de concentración de entre 0,078 $\mu\text{g/ml}$ y 40 $\mu\text{g/ml}$.

50 La **FIG. 12** muestra la validación del ensayo para autoanticuerpos contra ustekinumab (ATU) en una realización de la presente invención.

La **FIG. 13** muestra un diagrama esquemático de las realizaciones ejemplares del antígeno de integrina $\alpha 4$ soluble y el antígeno de integrina $\beta 7$ soluble de la presente invención. Izquierda: Proteínas de longitud completa. Derecha: Heterodímero de integrina $\alpha 4\beta 7$ truncado con un puente de cisteína del péptido ACID-BASE.

55 La **FIG. 14** muestra la linealidad de la dilución del fármaco en suero humano para (A) VLM y (B) autoanticuerpos contra vedolizumab (ATV).

60 La **FIG. 15** muestra un análisis de agentes de interferencia comunes en el suero: (A) interferencia de suero hemolizado; (B) interferencia del suero lipémico; y (C) interferencia en suero RF.

La **FIG. 16** muestra el principio del ensayo de cambio de movilidad homogéneo (HMSA) de ustekinumab (UTK).

65 La **FIG. 17** muestra la linealidad de la dilución en suero humano normal para (A) UTK y (B) autoanticuerpos contra ustekinumab (ATU).

La **FIG. 18** muestra un análisis de agentes de interferencia comunes en el suero: (A) interferencia de suero

hemolizado; (B) interferencia del suero lipémico; y (C) interferencia en suero RF.

La **FIG. 19** muestra la interferencia de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en una realización del ensayo VLM de la presente invención.

La **FIG. 20** muestra curvas patrón que usan cantidades fijas de vedolizumab marcado ("Vedo488") y antígeno de integrina $\alpha 4\beta 7$ (parte superior izquierda), así como cantidades de ambos reactivos aumentadas 2 veces (parte superior derecha) o aumentadas 4 veces (parte inferior izquierda). Obsérvese que el extremo superior de la curva satura a mayores concentraciones de VLM. De forma similar, el extremo inferior se aplanan a niveles ligeramente más elevados de VLM.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que un ensayo de cambio de movilidad homogéneo indirecto (HMSA) que utiliza cromatografía de exclusión por tamaños es particularmente ventajoso para medir la presencia o el nivel de productos biológicos que se dirigen a antígenos que tienen una o más de las siguientes características: de la superficie celular o unidos a membrana, (altamente) glucosilados, multiméricos (por ejemplo, forma heterodímeros, homodímeros, etc.), insolubles, difíciles de expresar, difíciles de purificar, de gran tamaño y combinaciones de los mismos. En ciertos aspectos, el uso de una forma soluble (por ejemplo, un fragmento soluble, variante o monómero) del antígeno supera las dificultades y limitaciones asociadas con los antígenos que tienen una o más de las características anteriores y permite la medición precisa y exacta de cualquier agente biológico de interés en una muestra de un paciente que recibe terapia con ese agente biológico.

El principio detrás de los ensayos indirectos de la presente invención es que la cantidad de agente biológico (no marcado) en una muestra (por ejemplo, suero) obtenida de un paciente que recibe terapia biológica determina cuánto antígeno no marcado permanece libre para unirse a una forma marcada del agente biológico. Al rastrear los cambios en el área del agente biológico marcado libre (sin unir), se puede determinar la presencia o el nivel de agente biológico (sin marcar) en la muestra del paciente. Más particularmente, la cantidad relativa (por ejemplo, relación) de productos biológicos marcados y no marcados determina la cantidad de antígeno que se une a cada uno y determina la cantidad (por ejemplo, área de pico) de los productos biológicos marcados libres después de la cromatografía de exclusión por tamaños. La cantidad (por ejemplo, el área del pico) del agente biológico marcado libre puede compararse con una curva patrón de cantidades conocidas del agente biológico para proporcionar una medición precisa de los niveles biológicos en la muestra del paciente con alta sensibilidad e intervalo dinámico. En determinadas realizaciones, el tamaño del área del pico del agente biológico marcado libre después de la cromatografía de exclusión por tamaños se calcula y compara con la curva patrón para interpolar la concentración de agente biológico en una muestra de paciente.

La importancia de medir las concentraciones séricas de productos biológicos se ilustra por el hecho de que la FDA requiere estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad (por ejemplo, respuesta inmunitaria) durante los ensayos clínicos. La presente invención también encuentra utilidad en la monitorización de pacientes que reciben estos medicamentos para asegurarse de que estén recibiendo la dosis correcta, que el medicamento no se elimina del cuerpo demasiado rápido y que no están desarrollando una respuesta inmunitaria contra el medicamento. Además, la presente invención es útil para guiar el cambio entre diferentes fármacos debido al fracaso con el fármaco inicial.

II. Definiciones

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen el significado que se les asigna a menos que se especifique lo contrario.

Los términos "un", "una", "uno" y "el/la", como se usan en el presente documento, no solo incluyen aspectos con un miembro, sino que también incluyen aspectos con más de un miembro. Por ejemplo, las formas del singular "un", "una", "uno" y "el/la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Los términos "competición", "basado en competición", e "indirecto" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un ensayo de la presente invención para determinar la presencia o el nivel de un agente biológico (sin marcar) en una muestra que se basa en la detección de la cantidad de productos biológicos marcados libres (no unidos) que quedan en la muestra después de añadir antígeno no marcado y agente biológico marcado (secuencialmente) a la muestra.

Los términos "VLM", "VDZ", y "Vedo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a vedolizumab.

Los términos y expresiones "biológico" o "agente biológico" o "medicamento biológico", como se usan en el presente documento, abarcan productos y sustancias producidas o extraídas de un sistema biológico (por ejemplo, un organismo vivo). Los ejemplos no limitantes de productos biológicos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión Ig o proteínas de fusión Fc),

proteínas de unión multivalentes (por ejemplo, DVD Ig), conjugados de anticuerpo y fármaco, vacunas, ácidos nucleicos, azúcares, formas recombinantes de los mismos, formas modificadas por ingeniería genética de los mismos y combinaciones de los mismos.

- 5 El término "anticuerpo" incluye moléculas grandes (150 kDa) en forma de "Y" que consisten en dos cadenas ligeras idénticas (~220 aminoácidos) y dos cadenas pesadas idénticas (~440 aminoácidos) que se mantienen juntas mediante una combinación de interacciones covalentes (disulfuro) y no covalentes. Cada cadena ligera y pesada consiste en segmentos repetidos de regiones constantes o variables que contienen un enlace disulfuro intracadena. Las regiones variables están ubicadas en el extremo N-terminal de las cadenas ligeras y pesadas, mientras que los dominios constantes están ubicados en el extremo C de las cadenas ligeras y pesadas. Los extremos N de las cadenas ligeras y pesadas se unen para formar el sitio de unión al antígeno. La cadena ligera se compone de un dominio variable y un dominio constante y la cadena pesada se compone de un dominio variable y tres dominios constantes. En los extremos de la "Y" hay ubicados dos sitios de unión a antígeno idénticos (bivalentes). La distancia entre los dos sitios de unión al antígeno varía debido a la región de bisagra flexible y, como resultado, la eficacia de unión del antígeno puede incrementarse enormemente. La formación de la región de unión al antígeno está causada por el emparejamiento de la región variable de la cadena pesada (V_H) con la región variable de la cadena ligera (V_L). Las variaciones en las secuencias de aminoácidos de las regiones variables son responsables de la gran diversidad de sitios de unión a antígeno y la mayor variabilidad se produce en tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La región de la cola del anticuerpo, conocida como la región Fc, se compone de dos dominios constantes (C_{H2} y C_{H3}) de cada una de las cadenas pesadas. La región Fc es responsable del reclutamiento de funciones efectoras a través de la unión de los receptores de Fc en neutrófilos y macrófagos.

El término "antígeno" incluye cualquier molécula, agente o sustancia que se une o interactúa (por ejemplo, específicamente) con un agente biológico. Como un ejemplo no limitante, el antígeno comprende un fragmento soluble, variante o monómero de una proteína unida a membrana, una proteína glucosilada, una proteína multimérica, una proteína insoluble, una proteína que es difícil de expresar o purificar y/o una proteína grande. Como otro ejemplo no limitante, el antígeno comprende un fragmento soluble de una molécula de superficie celular tal como un receptor de integrina (por ejemplo, integrina $\alpha\beta 7$), en donde el fragmento soluble contiene uno o más dominios extracelulares de la molécula de longitud completa correspondiente (por ejemplo, un heterodímero de antígeno $\alpha 4\beta 7$ soluble que comprende un dominio extracelular secuencias de las correspondientes proteínas $\alpha 4$ y $\beta 7$ de longitud completa). Como otro ejemplo no limitante adicional, el antígeno comprende una citocina como TNF α o una subunidad de la misma, tal como IL-12p40 que no forma homodímeros o heterodímeros.

El término "cromatografía de exclusión por tamaños" o "SEC" incluye un método cromatográfico en el cual las moléculas en solución se separan según su tamaño y/o volumen hidrodinámico. Se aplica a moléculas grandes o complejos macromoleculares, tales como proteínas y sus conjugados. Típicamente, cuando se utiliza una solución acuosa para transportar la muestra a través de la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración en gel.

El término "complejo" incluye un antígeno unido (por ejemplo, por medios no covalentes) a un agente biológico (por ejemplo, un agente biológico marcado o no marcado), y un agente biológico (por ejemplo, un agente biológico marcado) (por ejemplo, por medios no covalentes) unido a un autoanticuerpo contra el agente biológico.

Como se usa en el presente documento, una entidad modificada por el término "marcado" incluye cualquier antígeno, molécula, proteína, enzima, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, citocina o especies relacionadas que se conjuga con otra molécula o entidad química que es empíricamente detectable. Las especies químicas adecuadas como marcadores incluyen, pero sin limitación, colorantes fluorescentes, por ejemplo, colorantes Alexa Fluor®, tales como Alexa Fluor® 488, puntos cuánticos, tintes ópticos, tintes luminiscentes y radionúclidos, por ejemplo, ¹²⁵I.

La frase "detección de marcadores de fluorescencia" incluye un medio para detectar un marcador fluorescente. Los medios para la detección incluyen, pero sin limitación, un espectrómetro, un fluorímetro, un fotómetro y un dispositivo de detección comúnmente incorporado con un instrumento de cromatografía tal como, pero sin limitación, cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños, tales como, pero sin limitación, un sistema de HPLC Agilent-1200.

El término "sujeto", "paciente" o "individuo" típicamente incluye seres humanos, pero también incluye otros animales, tales como, por ejemplo, otros primates, roedores, canes, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

El término "muestra" incluye cualquier muestra biológica obtenida de un individuo. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre total, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células polimorfonucleares (PMN)), fluido de lavado ductal, aspirado del pezón, linfa (por ejemplo, células tumorales diseminadas del ganglio linfático), aspirado de médula ósea, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), esputo, líquido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado con aguja fina (por ejemplo, recogido por aspiración con aguja fina perialear aleatoria), cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido, tal como una biopsia de un sitio de inflamación (por ejemplo, biopsia con aguja), extractos celulares de los mismos y una fracción enriquecida con inmunoglobulina derivada de uno o más de estos fluidos o tejidos corporales. En algunas realizaciones, la muestra es

sangre entera, un componente fraccional de la misma, tal como plasma, suero o un sedimento celular o una fracción enriquecida con inmunoglobulina del mismo. Un experto en la materia apreciará que las muestras, tales como muestras de suero, pueden diluirse antes del análisis. En determinadas realizaciones, la muestra se obtiene aislando PBMC y/o células PMN usando cualquier técnica conocida en la técnica. En otras realizaciones concretas, la muestra es una

5 biopsia de tejido, tal como, por ejemplo, de un sitio de inflamación, tal como una porción del tracto gastrointestinal o tejido sinovial.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o polipéptido, denota que el ácido nucleico o el polipéptido están prácticamente exentos de otros componentes celulares con los que está asociado en su estado natural. Preferentemente, es un estado homogéneo, aunque puede encontrarse seco o en solución acuosa. La pureza y la homogeneidad se suelen determinar usando técnicas de química analítica, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Un polipéptido que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificado. En particular, un gen aislado se separa de los marcos abiertos de lectura que flanquean al gen y codifican una proteína distinta del gen de interés. El término "purificado" indica que

10 un ácido nucleico o polipéptido da lugar a esencialmente una banda en un gel de electroforesis. En particular, significa que el ácido nucleico o polipéptido es al menos aproximadamente un 80 % puro, al menos aproximadamente un 85 % puro, al menos aproximadamente un 90 % puro, al menos aproximadamente un 95 % puro o al menos aproximadamente un 99 % puro.

20 El término "soluble", en el contexto de un polipéptido, se refiere a un polipéptido que se puede preparar en una forma soluble y funcional usando una célula hospedadora o un sistema de síntesis de proteínas libre de células. Por ejemplo, un polipéptido soluble no forma agregados insolubles que comprenden polipéptidos mal plegados y/o funcionalmente inactivos.

25 El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en forma mono o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y

30 secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzet et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Cassol *et al.* (1992); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para incluir a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más

40 restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, formas truncadas o fragmentos de las mismas, en donde los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

45 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y no natural, así como a análogos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen naturalmente.

Los aminoácidos pueden citarse en el presente documento ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Adicionalmente, los nucleótidos pueden mencionarse por sus códigos de una letra habitualmente

50 aceptados.

Las etapas de los métodos de la presente invención no tienen que realizarse necesariamente en el orden particular en el que se presentan. Un experto habitual en la materia entenderá que están abarcadas otras ordenaciones de las etapas de los métodos de la invención, dentro del alcance de la presente invención.

55

Los corchetes, "[]" indican que la especie entre corchetes se citan por su concentración.

60 III. Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona nuevos ensayos de cambio de movilidad homogéneos indirectos para detectar y medir la presencia o nivel de un agente biológico en una muestra. Los ensayos de la presente invención son particularmente ventajosos para detectar la presencia o el nivel de agentes biológicos que se dirigen a antígenos complejos o grandes, incluyendo proteínas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas muy glicosiladas y proteínas multiméricas, así como antígenos que no pueden ser purificados, antígenos impuros y

65

antígenos parcial o sustancialmente purificados. La presente invención también proporciona heterodímeros de integrina $\alpha 4\beta 7$ solubles aislados y monómeros de IL-12p40 solubles aislados que son adecuados para su uso en los ensayos descritos en el presente documento.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la presencia o el nivel de un agente biológico en una muestra, comprendiendo el método:

10 (a) poner en contacto la muestra con un antígeno soluble no marcado que se une al agente biológico (por ejemplo, una pluralidad de complejos no marcados) para formar un complejo no marcado entre el antígeno y el agente biológico en la muestra;

(b) poner en contacto la muestra de la etapa (a) con una forma marcada del agente biológico ("agente biológico marcado") para formar un complejo marcado (por ejemplo, una pluralidad de complejos marcados) entre el antígeno y el agente biológico marcado;

15 (c) someter a los (por ejemplo, una pluralidad de) complejos marcados y no marcados a cromatografía de exclusión por tamaños para separar (por ejemplo, una pluralidad de) los complejos marcados y no marcados de los agentes biológicos marcados libres y para detectar una cantidad del agente biológico marcado libre; y

(d) comparar la cantidad del agente biológico marcado libre detectado en la etapa (c) con una curva patrón de cantidades conocidas del agente biológico, determinando de este modo la presencia o nivel del agente biológico en la muestra.

20 En algunas realizaciones, el agente biológico incluye anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, proteínas de unión multivalentes, conjugados de anticuerpo y fármaco, vacunas, ácidos nucleicos, azúcares, formas recombinantes de los mismos, formas modificadas por ingeniería genética de los mismos y combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, el agente biológico comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal) o un conjugado del mismo (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo-fármaco). En la tabla 1 se muestran ejemplos no limitantes de agentes biológicos a base de anticuerpos.

25 En realizaciones particulares, el método de la presente invención detecta la presencia y/o mide el nivel de agente biológico no unido (libre) en una muestra, por ejemplo, la población de agente biológico en una muestra que no está unida a su antígeno diana (endógeno) o un fragmento del mismo.

30 En determinadas realizaciones, el antígeno es una versión soluble (por ejemplo, un fragmento soluble, variante o forma monomérica) de una proteína unida a membrana, una proteína (altamente) glucosilada, una proteína multimérica, una proteína insoluble, una proteína que es difícil de expresar o purificar y/o una proteína grande. En ciertos casos, el antígeno es un dominio extracelular soluble de una proteína unida a membrana (por ejemplo, un dominio extracelular de receptor de citocina soluble). En ciertos casos diferentes, el antígeno es un homodímero o heterodímero soluble que comprende los dominios extracelulares de dos proteínas unidas a la membrana (por ejemplo, un heterodímero de integrina soluble). En otros casos más, el antígeno es una proteína soluble que no se multimeriza y permanece en forma monomérica una vez aislada y/o purificada (por ejemplo, una variante de citocina soluble con uno o más restos de cisteína mutados para minimizar o eliminar la formación de multímeros).

35 En algunas realizaciones, el antígeno es un fragmento soluble (por ejemplo, el dominio extracelular) de una molécula de la superficie celular, tal como, por ejemplo, una molécula de adhesión celular (CAM). Los ejemplos no limitantes de CAM incluyen las CAM de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), integrinas, cadherinas y selectinas.

40 Las CAM de IgSF son cualquiera de una variedad de polipéptidos o proteínas ubicadas en la superficie de una célula que tienen uno o más dominios de plegamiento de tipo inmunoglobulina y que funcionan en la adhesión intercelular y/o la transducción de señales. En muchos casos, las CAM de IgSF son proteínas transmembrana. Los ejemplos no limitantes de CAM de IgSF incluyen la molécula de adhesión celular de la addressina de la mucosa 1 (MADCAM1), las moléculas de adhesión celular neural (NCAM); por ejemplo, NCAM-120, NCAM-125, NCAM-140, NCAM-145, NCAM-180, NCAM-185, etc.), moléculas de adhesión intercelular (ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 e ICAM-5), molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1), molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas-1 (PECAM-1), molécula de adhesión celular L1 (L1CAM), molécula de adhesión celular con homología a L1CAM (homólogo cercano de L1) (CHL1), lectinas similares a Ig que se unen al ácido siálico (SIGLEC; por ejemplo, SIGLEC-1, SIGLEC-2, SIGLEC-3, SIGLEC-4, etc.), nectinas (por ejemplo, nectina-1, nectina-2, nectina-3, etc.), y moléculas similares a nectina (por ejemplo, Necl-1, Necl-2, Necl-3, Necl-4 y Necl-5).

45 Las integrinas son heterodímeros de $\alpha\beta$ transmembrana y se conocen al menos 18 subunidades α y ocho β en seres humanos, generando 24 heterodímeros. Las subunidades α y β tienen estructuras de dominio distintas, con dominios extracelulares de cada subunidad que contribuyen al sitio de unión al ligando del heterodímero. Los ejemplos no limitantes de integrinas incluyen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha E\beta 7$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$ y $\alpha D\beta 2$.

60 En realizaciones particulares, el antígeno es una integrina $\alpha 4\beta 7$ y el agente biológico es un fármaco anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ como vedolizumab (VLM). En ciertos casos, el fragmento soluble de la integrina $\alpha 4\beta 7$ que se une al fármaco anti-

integrina $\alpha 4\beta 7$ comprende un fragmento $\alpha 4$ que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 y/o un fragmento $\beta 7$ que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

- 5 En otras realizaciones, el antígeno es una integrina $\alpha 4\beta 1$ y el agente biológico es un fármaco anti-integrina $\alpha 4\beta 1$ como natalizumab. En ciertos casos, el fragmento soluble de la integrina $\alpha 4\beta 1$ que se une al fármaco anti-integrina $\alpha 4\beta 1$ comprende un heterodímero de los dominios extracelulares de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 1$.

- 10 Las cadherinas son proteínas transmembrana dependientes de calcio que juegan un papel importante en la adhesión celular, formando uniones adherentes para unir las células dentro de los tejidos. Los ejemplos no limitantes de cadherinas incluyen E-cadherina, N-cadherina, N-cadherina 2 y P-cadherina.

Las selectinas son CAM heterófilas que se unen a carbohidratos fucosilados, por ejemplo, mucinas. Los tres miembros de la familia son E-selectina (endotelial), L-selectina (leucocitos) y P-selectina (plaquetas).

- 15 En otras realizaciones, el antígeno es un fragmento soluble (por ejemplo, el dominio extracelular) de una molécula de la superficie celular, tal como, por ejemplo, un receptor de citocinas.

20 Los ejemplos no limitantes de receptores de citocinas incluyen receptores de citocinas de tipo I, receptores de citocinas de tipo II, miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig), receptores del factor de necrosis tumoral, receptores de quimiocinas y receptores de TGF β . Los ejemplos de receptores de citocinas de tipo I incluyen, pero sin limitación, receptores de interleucina (por ejemplo, receptor de IL-2, receptor de IL-3, receptor de IL-4, receptor de IL-5, receptor de IL-6, receptor de IL-7, receptor de IL-9, receptor de IL-11, receptor de IL-12, receptor de IL-13, receptor de IL-15, receptor de IL-21, receptor de IL-23, receptor de IL-27, etc.), receptores del factor estimulante de colonias (por ejemplo, receptor de eritropoyetina, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, etc.), receptores de hormonas o receptores de neuropéptidos (por ejemplo, receptor de la hormona del crecimiento, receptor de prolactina, etc.) y otros receptores de citocinas como el receptor de oncostatina M y el receptor del factor inhibidor de la leucemia. Los ejemplos de receptores de citocinas de tipo II incluyen, pero sin limitación, receptores de interferón (por ejemplo, receptor de interferón alfa/beta, receptor de interferón gamma, etc.) y receptores de interleucina (por ejemplo, receptor de IL-10, receptor de IL-20, receptor de IL-22, receptor de IL-28, etc.). Los ejemplos de receptores de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) incluyen, pero sin limitación, receptor de IL-1, CSF1, receptor de c-kit y receptor de IL-18. Los ejemplos de receptores de factor de necrosis tumoral incluyen, pero sin limitación, receptor de TNF (CD120), receptor de linfotoxina β , CD134, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, CD30, CD137, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, RANK, osteoprotegerina, TNFRSF12A, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, receptor del factor de crecimiento nervioso, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF21, TNFRSF25 y el receptor de ectodisplasina A2. Los ejemplos de receptores de quimiocinas incluyen, pero sin limitación, receptores de quimiocinas CXC, receptores de quimiocinas CC, receptores de quimiocinas C y receptores de quimiocinas CX3C. Los ejemplos de receptores de TGF β incluyen, pero sin limitación, receptor 1 de TGF β , receptor 2 de TGF β y receptor 3 de TGF β .

- 40 En determinadas realizaciones, el antígeno es un receptor de IL-6 y el agente biológico es un fármaco anti-receptor de IL-6 como tocilizumab. En ciertos casos, el fragmento soluble del receptor de IL-6 que se une al fármaco anti-receptor de IL-6 comprende un dominio extracelular del receptor de IL-6.

45 En otras realizaciones más, el antígeno es un fragmento soluble (por ejemplo, un dominio extracelular) de una molécula de agrupación de diferenciación (CD). Los ejemplos no limitantes de moléculas de CD incluyen CD3, CD4, CD8, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD31, CD34, CD38, CD45, CD56, CD61, CD91, CD114, CD117, CD182 y similares. En ciertos casos, el agente biológico que se une a un fragmento soluble de una molécula de CD es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en visilizumab, priliximab, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, ocrelizumab, veltuzumab, daclizumab y combinaciones de los mismos.

50 En algunas realizaciones, el antígeno es una citocina o un monómero de la misma (por ejemplo, una variante de citocina soluble con uno o más restos de cisteína mutados para minimizar o eliminar la formación de multímeros).

55 Los ejemplos no limitantes de citocinas incluyen TNF α , inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), osteoprotegerina (OPG), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , interleucinas (por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, receptor de IL-6 soluble (sIL-6R), IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-27), adipocitocinas (por ejemplo, leptina, adiponectina, resistina, inhibidor-1 de activador de plasminógeno activo o total (PAI-1), visfatina y proteína 4 de unión a retinol (RBP4)) y similares.

60 En realizaciones particulares, la citocina es una subunidad p40 de IL-12 o IL-23 y el agente biológico es un medicamento anti-IL-12p40 como ustekinumab (UTK). En ciertos casos, la citocina es una variante de p40 que comprende uno o más restos de cisteína mutados para minimizar o eliminar la formación de multímeros. En algunos casos, la variante de p40 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12 o 13.

65

En otras realizaciones, la citocina es TNF α y el agente biológico es un fármaco anti-TNF α . Los ejemplos no limitantes de medicamentos anti-TNF α incluyen REMICADE® (infliximab), HUMIRA® (adalimumab), ENBREL® (etanercept), CIMZIA® (certolizumab pegol), SIMPONI® (golimumab) y combinaciones de los mismos.

5 Los antígenos solubles descritos en el presente documento pueden producirse por cualquier método conocido por un experto habitual en la técnica, tal como, pero sin limitación, métodos sintéticos, tales como síntesis en fase sólida y en fase líquida o métodos de biología recombinante.

10 En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre entera, suero o plasma, por ejemplo, obtenida de un sujeto que recibe terapia biológica. En realizaciones preferidas, la muestra es suero. En realizaciones particulares, el sujeto tiene una enfermedad o trastorno, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), tal como enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU)) o cáncer.

15 En realizaciones particulares, la curva patrón se genera incubando el antígeno y el agente biológico marcado con una dilución en serie (por ejemplo, de factor dos) de cantidades conocidas del agente biológico. En determinadas realizaciones, el área bajo la curva (ABC) del agente biológico marcado libre se representa contra (por ejemplo, el logaritmo de) cantidades conocidas del agente biológico obtenidas de la curva patrón y se calcula por interpolación el nivel del agente biológico en la muestra, por ejemplo, basándose en el tamaño del área del pico del agente biológico libre marcado. En otras realizaciones, se determina una relación del agente biológico marcado libre a un control de carga (por ejemplo, marcador libre) y se utiliza para normalizar el nivel del agente biológico en la muestra a partir de la curva patrón.

25 En determinadas realizaciones, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños (SE-HPLC). En realizaciones particulares, los (por ejemplo, la pluralidad de) complejos sin marcar y marcados se eluyen primero a través de una fase estacionaria, seguido del agente biológico marcado libre. El principio subyacente de la SEC es que las moléculas o complejos de diferentes tamaños se eluirán (filtrarán) a través de una fase estacionaria a diferentes velocidades. Esto da como resultado la separación de una solución de moléculas o complejos en función del tamaño. Siempre que todas las moléculas o complejos se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las moléculas o complejos del mismo tamaño se eluyen juntos. Cada columna de exclusión por tamaños tiene un intervalo de pesos moleculares que se pueden separar. El límite de exclusión define el peso molecular en el extremo superior de este intervalo y es donde las moléculas o complejos son demasiado grandes para ser atrapados en la fase estacionaria. El límite de permeación define el peso molecular en el extremo inferior del intervalo de separación y es donde las moléculas o complejos de un tamaño lo suficientemente pequeño pueden penetrar completamente en los poros de la fase estacionaria y todas las moléculas o complejos por debajo de esta masa molecular son tan pequeños que se eluyen como una sola banda.

35 En algunos casos, el eluyente se recoge en volúmenes constantes o fracciones. Cuanto más similares son las moléculas o los complejos en cuanto a su tamaño, más probable será que se encuentren en la misma fracción y no se detecten por separado. Preferentemente, las fracciones recogidas se examinan mediante técnicas espectroscópicas para determinar la concentración de las moléculas o complejos eluidos. Típicamente, las técnicas de detección por espectroscopia útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, fluorometría, índice de refracción (IR) y ultravioleta (UV). En ciertos casos, el volumen de elución disminuye aproximadamente linealmente con el logaritmo del volumen hidrodinámico molecular (es decir, las moléculas o los complejos más pesados se desprenden en primer lugar).

40 Un agente biológico (por ejemplo, anticuerpo terapéutico) puede marcarse con cualquiera de una variedad de grupos detectables. En determinadas realizaciones, un agente biológico está marcado con un fluoróforo o un tinte fluorescente. En otras realizaciones, un agente biológico está marcado con un marcador luminiscente, un metal, un radionúclido y similares. La unión inmunológica específica de un antígeno a un agente biológico marcado o la cantidad de agente biológico marcado libre puede detectarse directa o indirectamente. Se puede analizar una señal de la marcador directa o indirecta, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico, un contador de radiación para detectar radiación, como un contador gamma para la detección de ¹²⁵I o un fluorómetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz de una cierta longitud de onda.

55 Los ejemplos no limitantes de fluoróforos o tintes fluorescentes incluyen los enumerados en el catálogo de Molecular Probes (véase, R. Haugland, *The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10.^a edición, Molecular probes, Inc. (2005)). Dichos fluoróforos o colorantes fluorescentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, colorantes Alexa Fluor®, tales como Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 635, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750 y/o Alexa Fluor® 790, así como otros fluoróforos que incluyen, pero sin limitación, cloruro de dansilo (DNS-C1), 5-(yodoacetamida)fluoresceína (5-IAF), 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5- (y 6-)isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodan), cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD-Cl), bromuro de etidio, Lucifer Yellow, clorhidrato de 5-carboxirrodamina 6G, cloruro de sulfonil rodamina B Lissamine, Texas Red™ cloruro de sulfonilo, BODIPY™, ácidos naftalamina sulfónicos (por ejemplo, ácido 1-

5 anilinoftaleno-8-sulfónico (ANS), ácido 6-(p-toluidinil)naftaleno-2-sulfónico (TNS) y similares), ácido graso de antroilo, DPH, ácido parinárico, TMA-DPH, ácido graso de fluorenilo, fluoresceína-fosfatidiletanolamina, Texas Red-fosfatidiletanolamina, pirenil-fosfatidilcolina, fluorenilfosfatodilcolina, Merocianina 540, 1-(3-sulfonatopropil)-4-β-[2]([di-
 10 aminoestiril)-1-metilpiridinio (di-5-ASP), Cy-3 yodoacetamida, Cy-5-N-hidroxisuccinimida, Cy-7-isotiocianato, rodamina 800, IR-125, naranja de tiazol, Azure B, azul Nilo, A1 ftalocianina, Oxaxina 1, 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, naranja de acridina, homodímero de etidio, N(etoxicarbonilmetil)-6-metoxiquinolinio (MQAE), Fura-2, verde de calcio, carboxi SNARF-6, BAPTA, cumarina, fitofluores, coroneno, complejos de metal-ligando, IRDye® 700DX, IRDye® 700, IRDye® 800RS, IRDye® 800CW, IRDye® 800, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY 676, DY680,
 15 DY682, DY780 y mezclas de los mismos. Los fluoróforos adecuados adicionales incluyen enzimas-cofactores; lantanida, proteína verde fluorescente, proteína amarilla fluorescente, proteína roja fluorescente o mutantes y derivados de las mismas.

15 Típicamente, el grupo fluorescente es un fluoróforo seleccionado entre la categoría de colorantes que comprenden polimetinas, ftalocianinas, cianinas, xantenos, fluorenos, rodaminas, cumarinas, fluoresceínas y BODIPY™.

20 En determinadas realizaciones, el grupo fluorescente es un fluoróforo infrarrojo cercano (NIR) que emite en el intervalo de aproximadamente 650 a aproximadamente 900 nm. El uso de la tecnología de fluorescencia del infrarrojo cercano es ventajoso en los ensayos biológicos, ya que elimina o reduce sustancialmente el fondo de la fluorescencia automática de los sustratos biológicos. Otro beneficio de la tecnología de fluorescencia de infrarrojo cercano es que la luz dispersada de la fuente de excitación se reduce considerablemente ya que la intensidad de dispersión es proporcional a la cuarta potencia inversa de la longitud de onda. La baja fluorescencia de fondo y la baja dispersión dan como resultado una alta relación señal/ruido, lo cual es esencial para una detección altamente sensible. Además, la ventana ópticamente transparente en la región del IR cercano (650 nm a 900 nm) en el tejido biológico hace que la fluorescencia NIR sea una tecnología valiosa para las aplicaciones de imágenes *in vivo* y detección subcelular que requieren la transmisión de luz a través de componentes biológicos. En los aspectos de esta realización, el grupo fluorescente se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en IRDye® 700DX, IRDye® 700, IRDye® 800RS, IRDye® 800CW, IRDye® 800, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY 676, DY680, DY682 y DY780. En determinadas realizaciones, el grupo de infrarrojo cercano es IRDye® 800CW, IRDye® 800, IRDye® 700DX, IRDye® 700 o Dynamic DY676.

35 El marcado fluorescente se puede lograr usando un derivado químicamente reactivo de un fluoróforo. Los grupos reactivos comunes incluyen derivados de isotiocianato reactivos con amina, tales como FITC y TRITC (derivados de fluoresceína y rodamina), ésteres de succinimidilo reactivos con amina, tales como NHS-fluoresceína y fluores activados con maleimida reactivos con sulfhidrilo, tales como fluoresceína-5-maleimida, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. La reacción de cualquiera de estos colorantes reactivos con un agente biológico da como resultado un enlace covalente estable formado entre un fluoróforo y un agente biológico.

40 En ciertos casos, tras una reacción de marcaje fluorescente, a menudo es necesario eliminar cualquier fluoróforo no reaccionado de la molécula diana marcada. Esto se logra a menudo por cromatografía de exclusión por tamaños, aprovechando la diferencia de tamaños entre el fluoróforo y la proteína marcada.

45 Los tintes fluorescentes reactivos están disponibles de muchas fuentes. Pueden obtenerse con diferentes grupos reactivos para unirse a varios grupos funcionales dentro de la molécula diana. También están disponibles en kits de marcado que contienen todos los componentes para llevar a cabo una reacción de marcado. En ciertos casos, Se usa el éster de NHS de Alexa Fluor® 488 de Life Technologies (n.º de cat. A-10235).

IV. Ensayos de cambio de movilidad homogéneos indirectos

50 La presente invención proporciona nuevos ensayos indirectos para detectar y medir la presencia o el nivel de un agente biológico ("fármaco") en una muestra mediante cromatografía de exclusión por tamaños. Los ensayos de la presente invención son particularmente ventajosos para detectar la presencia o el nivel de fármacos que se dirigen a antígenos complejos o grandes, incluyendo proteínas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas muy glicosiladas y proteínas multiméricas, así como antígenos que no pueden ser purificados, antígenos impuros y antígenos parcial o sustancialmente purificados. Los antígenos no están marcados y, por lo tanto, los complejos de fármaco/antígeno del paciente no aparecen en el cromatograma. El principio detrás de los ensayos indirectos es que la cantidad de medicamento para el paciente determina la cantidad de antígeno no marcado que permanece libre para unirse a una versión marcada del fármaco. Al rastrear los cambios en el área del fármaco libre marcado (sin unir), se puede determinar la cantidad de fármaco presente en el paciente.

60 En ciertos aspectos, la primera etapa de los ensayos indirectos descritos en el presente documento comprende incubar una muestra (por ejemplo, suero) que contiene un fármaco terapéutico (por ejemplo, vedolizumab (VDZ)) con una cantidad fija de antígeno para el fármaco (por ejemplo, α4β7 soluble). En la segunda etapa, se agrega una cantidad fija de medicamento marcado (por ejemplo, VDZ junto con Alexa Fluor® 488). La cantidad de fármaco terapéutico en la muestra determina cuánto antígeno permanece libre y disponible para unirse al fármaco marcado. Esto, a su vez, determina qué cantidad del fármaco marcado está libre. Dado que el área del pico del fármaco marcado libre es

proporcional a la cantidad de fármaco terapéutico en la muestra, se puede cuantificar la cantidad de fármaco terapéutico por interpolación contra una curva patrón que contiene cantidades conocidas de fármaco.

La siguiente descripción de los principios de los ensayos indirectos de la invención utiliza vedolizumab (VDZ) como fármaco terapéutico solo con fines ilustrativos (véase la figura 1) y no pretende limitar el alcance de la metodología de ensayo para detectar o medir la Presencia o nivel de otros productos biológicos en muestras de pacientes:

1. A cada muestra de paciente (por ejemplo, suero), se le añaden cantidades fijas de antígeno (por ejemplo, $\alpha 4\beta 7$ soluble) y VDZ marcado. La cantidad de antígeno y VDZ marcado se puede agregar a cada muestra en una proporción controlada. Por ejemplo, la adición de una cantidad de antígeno que se uniría a aproximadamente el 75-80 % de VDZ marcado proporciona una sensibilidad óptima sin limitar el intervalo dinámico del ensayo. La relación de antígeno a VDZ marcado se determinó mediante la titulación del antígeno con una cantidad fija de VDZ marcado de manera que cuando el antígeno se agrega al VDZ marcado, el pico de VDZ marcado libre se reduce en aproximadamente un 75-80 % (véase la figura 2).

2. La cuantificación se puede realizar siguiendo el aumento del área del pico de VDZ marcado ($T_r = 7,5-8,5$ min). Esta área es proporcional a la cantidad de fármaco terapéutico presente. Puede añadirse Alexa488 bloqueado con Tris a soluciones madre de VDZ marcado como control de carga. Los cromatogramas sin procesar pueden recogerse el sistema en Agilent ChemStation y luego exportarse al programa "R" para su análisis automatizado. La curva patrón se puede generar al trazar el área del pico de VDZ marcado como una función del registro de concentraciones de muestra VDZ conocidas. Se puede utilizar una curva patrón de 10 puntos y se puede ajustar con un modelo logístico de 5 parámetros (5-PL) para tener en cuenta la asimetría. Las incógnitas se pueden determinar a partir de la curva patrón por interpolación.

En determinadas realizaciones, la proporción de antígeno a fármaco marcado que se agrega a una muestra es una cantidad de cada reactivo que proporciona el mejor compromiso entre la sensibilidad de bajo nivel necesaria y un intervalo dinámico que permite la medición del fármaco en muestras de pacientes sin necesidad de diluciones. Como un ejemplo no limitativo, la proporción de antígeno a fármaco marcado que se agrega a una muestra es una cantidad de antígeno que se une entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 80 % (por ejemplo, aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79% u 80%) del fármaco marcado. En algunos casos, la proporción de antígeno a fármaco marcado que se agrega a una muestra es una cantidad de antígeno que se une al menos a aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % del fármaco marcado. En otros casos, la proporción de antígeno a fármaco marcado que se agrega a una muestra es una cantidad de antígeno que se une a de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 70 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 % o de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 % del fármaco marcado. La proporción de antígeno a fármaco marcado se puede determinar mediante la titulación del antígeno con una cantidad fija de fármaco marcado, de manera que cuando el antígeno se agrega al fármaco marcado, el pico del fármaco marcado libre se reduce en un porcentaje deseado (por ejemplo, aproximadamente un 75-80 %).

En otras realizaciones concretas, el intervalo dinámico de los ensayos indirectos descritos en el presente documento puede mejorarse aumentando proporcionalmente la cantidad de antígeno y fármaco marcado que se agrega a una muestra. En algunos casos, la cantidad de antígeno y fármaco marcado puede ser aproximadamente 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces o 10 veces mayor que una cantidad de referencia de antígeno y fármaco marcado. Como un ejemplo no limitativo, la cantidad de referencia de VDZ marcado puede ser de aproximadamente 75 ng y la cantidad incrementada de VDZ marcado puede ser de aproximadamente 120 ng (es decir, 1,6 veces más que la cantidad de referencia).

En algunas realizaciones, el límite inferior de cuantificación (LLOQ) de los ensayos indirectos descritos en el presente documento es de aproximadamente 0,125 $\mu\text{g/ml}$, 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,375 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 0,625 $\mu\text{g/ml}$, 0,75 $\mu\text{g/ml}$, 0,875 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,75 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ o 5 $\mu\text{g/ml}$. En otras realizaciones, el límite superior de cuantificación (ULOQ) de los ensayos indirectos descritos en el presente documento es de aproximadamente 8 $\mu\text{g/ml}$, 9 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 11 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 13 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 17 $\mu\text{g/ml}$, 18 $\mu\text{g/ml}$, 19 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 21 $\mu\text{g/ml}$, 22 $\mu\text{g/ml}$, 23 $\mu\text{g/ml}$, 24 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 26 $\mu\text{g/ml}$, 27 $\mu\text{g/ml}$, 28 $\mu\text{g/ml}$, 29 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 35 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 45 $\mu\text{g/ml}$ o 50 $\mu\text{g/ml}$. En realizaciones particulares, el LLOQ es de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ y el ULOQ es de aproximadamente 25 $\mu\text{g/ml}$.

V. Antígenos de polipéptidos de integrina $\alpha 4\beta 7$ solubles

En un aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido de

- integrina $\alpha 4$ soluble aislado comprende repeticiones de hélice β (es decir, repeticiones 1-7) y un dominio thigh del dominio extracelular de integrina $\alpha 4$ humana (véase la figura 13; " $\alpha 4\Delta 620$ ") o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, el polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado comprende repeticiones de hélice β , un dominio thigh y uno o ambos dominios Calf (es decir, Calf-1 y/o Calf-2) del dominio extracelular de la integrina $\alpha 4$ humana o un fragmento del mismo. En otras realizaciones más, el polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado es un receptor truncado que comprende todo el dominio extracelular de integrina $\alpha 4$ humana. El polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado descrito en el presente documento incluye un dominio de unión a ligando o una porción del mismo.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado también incluye un péptido ACID. Dicho péptido puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 8. Un péptido ACID puede formar una conformación de bucle superenrollado α helicoidal con un péptido BASE. En algunas realizaciones, el péptido ACID incluye un resto de cisteína que puede formar un puente disulfuro con un resto de cisteína en el péptido BASE. Los péptidos de la región de bucle superenrollado ácidos (péptidos ACID) y péptidos de región de bucle superenrollado básicos (péptidos BASE) se describen en, por ejemplo, O'Shea et al., *Curr Biol*, 1993, 3:658-667, Jun et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2001, 98(12):6830-6835, Takagi et al., *Nat Struct. Biol.*, 2001, 8:412-416, Nishida et al., *Immunity*, 2006, 25:583-594 y Dong et al., *Biochemistry*, 2012, 51(44):8814-8828.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado incluye un enlazador, tal como uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos. El enlazador puede ubicarse entre el extremo del dominio extracelular y el péptido ACID.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 3.
- El polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble también puede incluir un marcador de afinidad o marcador de epítipo, tal como un marcador de histidina, marcador de avidina, marcador de V5, marcador FLAG, marcador HA, marcador Myc, marcador escindible y similares. En algunos casos, el polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble puede incluir un marcador fluorescente, tal como GFP, DsRed, CFP, YFP, RFP y similares u otro marcador detectable, tal como peroxidasa de rábano picante, cloranfenicol acetiltransferasa, beta-galactosidasa, luciferasa y similares.
- En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado comprende un dominio PSI, un dominio de tipo I, dominios híbridos y un dominio de I-EGF 1 del dominio extracelular de integrina $\beta 7$ humana (véase la figura 13; " $\beta 7\Delta 527$ ") o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado comprende uno o más del dominio PSI, el dominio de tipo I y uno o ambos dominios híbridos del dominio extracelular de integrina $\beta 7$ humana o un fragmento del mismo. En otras realizaciones más, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado comprende un dominio PSI, un dominio de tipo I, dominios híbridos, dominios I-EGF (es decir, dominios 1-4), y opcionalmente una cola β del dominio extracelular de integrina $\beta 7$ humana o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado es un receptor truncado que comprende todo el dominio extracelular de integrina $\beta 7$ humana. El polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble descrito en el presente documento incluye un dominio de unión a ligando o una porción del mismo.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado también incluye un péptido BASE. Dicho péptido puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 9. Un péptido BASE puede formar una conformación de bucle superenrollado α helicoidal con un péptido ACID.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado incluye un sitio de escisión de proteasa. En algunos casos, el sitio de escisión es un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). El sitio TEV puede incluir la secuencia de aminoácidos EXXYXQ/S, en donde X es cualquier resto de aminoácido (SEQ ID NO: 10). El sitio de TEV puede estar situado cadena arriba del péptido BASE.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado incluye un enlazador, tal como uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos. El enlazador puede ubicarse entre el extremo del dominio EGF-I del dominio extracelular de integrina $\beta 7$ y el sitio de escisión.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado comprende además un marcador de afinidad o marcador de epítipo. Los marcadores de afinidad o epítipo útiles incluyen, pero sin limitación, un marcador de histidina, marcador de avidina, marcador de V5, marcador FLAG, marcador HA, marcador Myc, marcador escindible y

similares. En algunos casos, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble puede incluir un marcador fluorescente, tal como GFP, DsRed, CFP, YFP, RFP y similares u otro marcador detectable, tal como peroxidasa de rábano picante, cloranfenicol acetiltransferasa, beta-galactosidasa, luciferasa y similares.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 4.

10 El polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble aislado puede asociarse con un polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble descrito en el presente documento para formar un complejo, tal como un heterodímero unido covalentemente. En algunos casos, el complejo de integrina $\alpha 4\beta 7$ puede unirse a los ligandos $\alpha 4\beta 7$, tales como, pero sin limitación VCAM-1 y MAdCAM-1 y a anticuerpos dirigidos contra la integrina $\alpha 4\beta 7$, tales como, pero sin limitación, vedolizumab, natalizumab y etrolizumab.

15 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble aislado que comprende un polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido de integrina $\alpha 4$ está unido a un primer miembro de un par de unión y un polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido de integrina $\beta 7$ está unido a un segundo miembro del par de unión.

25 En algunas realizaciones, el par de unión puede ser cualquier péptido, moléculas, motivos y compuestos que pueden permitir que la subunidad $\alpha 4$ y la subunidad $\beta 7$ formen un heterodímero, tal como un heterodímero unido covalentemente. El heterodímero $\alpha 4\beta 7$ es capaz de unirse a los ligandos $\alpha 4\beta 7$, tales como, pero sin limitación, VCAM-1 y MAdCAM-1 y a anticuerpos dirigidos contra la integrina $\alpha 4\beta 7$, tales como, pero sin limitación, vedolizumab, natalizumab y etrolizumab. El polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble y el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble pueden heterodimerizarse a través de un puente de cisteína o un derivado del mismo (véase la figura 13). En algunas realizaciones, el par de unión se selecciona entre el grupo que consiste en péptidos de bucle superenrollado, péptidos de cremallera de leucina, péptidos de tipo "dock-and-lock", avidina-biotina y derivados de los mismos. En algunos casos, los péptidos de bucle superenrollado son péptidos ACID-BASE.

30 Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, tal como, pero sin limitación, métodos sintéticos, tales como síntesis en fase sólida y en fase líquida o métodos de biología recombinante, tales como los descritos en el presente documento.

35 En otros aspectos, la presente descripción proporciona un vector de expresión que codifica un polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer miembro de un par de unión y una segunda secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo miembro del par de unión. En algunas realizaciones, el primer miembro del par de unión es un péptido ACID. En algunas realizaciones, el primer miembro del par de unión es un péptido BASE. En algunos casos, la segunda secuencia de polinucleótidos comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de afinidad, tal como un marcador de histidina. En algunos casos, la segunda secuencia de polinucleótidos comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión de proteasa, tal como un sitio TEV.

40 En algunas realizaciones, la primera secuencia polinucleotídica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 4.

65 En algunas realizaciones, el vector de expresión es capaz de dirigir la expresión de las secuencias de polinucleótidos

de manera preferencial en un tipo celular particular. El vector de expresión puede ser un plásmido, fago, fagémido, cósmido, bacteriófago, vector de baculovirus, vector lentivírico, vector retrovírico, vector adenovírico, plásmido de levadura y similares. El vector de expresión también puede comprender un promotor. Los promotores útiles incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles. La primera secuencia de polinucleótidos y/o la segunda secuencia de polinucleótidos del vector de expresión pueden unirse operativamente a un promotor. El promotor puede seleccionarse dependiendo de la célula hospedadora que contiene el vector de expresión o puede usarse para generar o producir el polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble codificado por el vector de expresión descrito en el presente documento. El vector de expresión puede incluir elementos reguladores, un casete marcador de selección, casete de resistencia a antibióticos o cualquier otro componente que facilite la expresión del polipéptido por una célula hospedadora.

En algunas realizaciones, la primera y la segunda secuencia de polinucleótidos se encuentran en un solo vector de expresión. Dicha secuencia de polinucleótido puede localizarse en un vector de expresión bicistrónico de modo que una secuencia de IRES se ubique entre las secuencias de polinucleótido primera y segunda en el vector. Un solo promotor puede dirigir la expresión de ambas secuencias de polinucleótidos. En algunas realizaciones, la primera secuencia de polinucleótidos está unida operativamente al promotor y se localiza inmediatamente cadena arriba de una secuencia de ácido nucleico que codifica un salto ribosomal, tal como un péptido viral 2A, que está inmediatamente cadena arriba de la segunda secuencia de polinucleótidos. En otras realizaciones, la segunda secuencia de polinucleótidos está unida operativamente al promotor y se localiza inmediatamente cadena arriba de una secuencia de ácido nucleico que codifica un salto ribosómico que está inmediatamente cadena arriba de la primera secuencia de polinucleótidos. El polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble y el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble pueden generarse a partir de un vector de expresión.

Los expertos en la técnica conocen métodos para construir un vector de expresión. Se describen descripciones detalladas de protocolos y métodos en, por ejemplo, Green, M. R. y Sambrook, J., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2012), Ausubel, F. M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento 99), John Wiley & Sons, Nueva York (2012); Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology: Volumen 152*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, (1987); y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA, (1990).

En otros aspectos, la presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende uno cualquiera de los vectores de expresión que codifican un polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble descrito en el presente documento. La célula hospedadora puede ser una línea celular estable, tal como, pero sin limitación, células HEK293, células CHO, células COS, células Jurkat, células NIH3T3 y derivados de las mismas. La célula hospedadora puede ser una célula bacteriana, célula de levadura, célula fúngica, célula de alga, célula vegetal, célula de insecto, célula animal, célula de mamífero, célula no humana o célula humana. Se describen células hospedadoras adecuadas en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 185, Academic Press, San Diego, CA, (1990).

El vector de expresión se puede introducir en la célula hospedadora mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, transformación, transfección, lipofección, nucleofección, microinyección, electroporación, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, plicación o conjugados de lípido:polinucleótido, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN potenciada por agentes.

En otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para generar un polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble codificado por uno cualquiera de los vectores de expresión descritos en el presente documento. El método comprende (a) introducir el vector de expresión que codifica el polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble en una célula hospedadora, (b) cultivar la célula hospedadora resultante en condiciones para producir el polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble y (c) aislar el polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble.

Las células que contienen el vector de expresión pueden cultivarse en condiciones que permiten, promueven o inducen la producción del polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble.

El polipéptido de integrina $\alpha 4$ soluble, el polipéptido de integrina $\beta 7$ soluble y el polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ soluble pueden purificarse a partir de, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular o fracción soluble de un extracto celular, de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, *Protein Purification*, J. C. Janson y Lars Ryden, eds., VCH Publishers, Nueva York, (1989)) para obtener polipéptidos sustancialmente puros. Los métodos para la purificación de proteínas, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización se describen en, por ejemplo, Coligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, (2000).

El polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ recombinante soluble puede formar complejos con su ligando afin, tal como un ligando que se une específicamente a integrina $\alpha 4\beta 7$ de longitud completa de tipo silvestre. El polipéptido de integrina $\alpha 4\beta 7$ recombinante soluble puede ser un antígeno para un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4\beta 7$.

VI. Antígenos del polipéptido IL-12p40 soluble

En un aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido IL-12p40 soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de las SEQ ID NO: 6, 11, 12 o 13. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende además un marcador de afinidad. En otras realizaciones, el polipéptido IL-12p40 soluble aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende además un marcador de afinidad. En realizaciones particulares, el polipéptido IL-12p40 soluble es un monómero y no puede dimerizarse ni formar multímeros.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector de expresión que codifica un polipéptido IL-12p40 soluble que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-12p40 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de las SEQ ID NO: 6, 11, 12 o 13. La secuencia de polinucleótidos puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de afinidad. Dicho marcador de afinidad puede ser un marcador de histidina, tal como la hexahistidina. Otros ejemplos no limitantes de marcadores de afinidad incluyen un marcador de avidina, marcador de V5, marcador FLAG, marcador HA, marcador Myc, marcador escindible y similares. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-12p40 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, respecto de la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, el vector de expresión es capaz de dirigir la expresión de las secuencias de polinucleótidos de manera preferencial en un tipo celular particular. El vector de expresión puede ser un plásmido, fago, fagémido, cósmido, bacteriófago, vector de baculovirus, vector lentivírico, vector retrovírico, vector adenovírico, plásmido de levadura y similares. El vector de expresión también puede comprender un promotor. Los promotores útiles incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles. La secuencia de polinucleótidos del vector de expresión puede unirse operativamente a un promotor. El promotor puede seleccionarse dependiendo de la célula hospedadora seleccionada para generar o producir el polipéptido IL-12p40 soluble codificado por el vector de expresión descrito en el presente documento. El vector de expresión puede incluir elementos reguladores, un casete marcador de selección, casete de resistencia a antibióticos o cualquier otro componente que facilite la expresión del polipéptido.

Los expertos en la técnica conocen métodos para construir un vector de expresión. Se describen descripciones detalladas de protocolos y métodos en, por ejemplo, Green, M. R. y Sambrook, J., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4.ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2012); Ausubel, F. M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento 99), John Wiley & Sons, Nueva York (2012); Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1987); y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA, (1990).

En otros aspectos, la presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende uno cualquiera de los vectores de expresión que codifican un polipéptido IL-12p40 soluble descrito en el presente documento. La célula hospedadora puede ser una línea celular estable, tales como, pero sin limitación, células HEK293, células CHO, células COS, células Jurkat, células NIH3T3 y derivados de las mismas. La célula hospedadora puede ser una célula bacteriana, célula de levadura, célula fúngica, célula de alga, célula vegetal, célula de insecto, célula animal, célula de mamífero, célula no humana o célula humana. Se describen células hospedadoras adecuadas en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990.

El vector de expresión se puede introducir en la célula hospedadora mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, transformación, transfección, lipofección, nucleofección, microinyección, electroporación, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, policación o conjugados de lípido:polinucleótido, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN potenciada por agentes.

En otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para generar un polipéptido IL-12p40 soluble codificado por uno cualquiera de los vectores de expresión descritos en el presente documento. El método comprende (a) introducir el vector de expresión que codifica el polipéptido IL-12p40 soluble en una célula hospedadora, (b) cultivar la célula hospedadora resultante en condiciones para producir el polipéptido IL-12p40 soluble, y (c) aislar el polipéptido IL-12p40 soluble.

Las células que contienen el vector de expresión pueden cultivarse en condiciones que permiten, promueven o inducen la producción del polipéptido IL-12p40 soluble.

El polipéptido IL-12p40 soluble se puede purificar a partir de, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular o fracción soluble de un extracto celular, de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco y exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J. C. Janson y Lars Ryden, eds., VCH Publishers, Nueva York, (1989)) para obtener polipéptidos sustancialmente puros. Los métodos para la purificación de proteínas, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización se describen en, por ejemplo, Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, (2000).

A diferencia de IL-12p40 de tipo silvestre, el polipéptido IL-12p40 recombinante soluble descrito en el presente documento no puede formar un dímero, trímero u oligómero. En realizaciones particulares, la presencia de dos sustituciones de cisteína por alanina (SEQ ID NO: 6) o de dos sustituciones de cisteína por serina (SEQ ID NO: 11) en la secuencia del polipéptido IL-12p40 de tipo natural impide que el antígeno IL-12p40 se oligomerice. En otras realizaciones, el monómero polipeptídico de IL-12p40 soluble tiene la secuencia del polipéptido IL-12p40 de tipo silvestre con una sustitución de cisteína por alanina y una sustitución de cisteína por alanina (SEQ ID NO: 12 o 13). Un anticuerpo anti-IL-12p40, tal como ustekinumab, puede unirse específicamente al polipéptido IL-12p40 recombinante soluble.

VII. Terapia biológica

Los ensayos de desplazamiento de movilidad homogéneos indirectos de la presente invención son adecuados para detectar y/o medir la presencia o el nivel de un agente biológico en una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que recibe terapia biológica). Los ejemplos no limitantes de productos biológicos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión Ig o proteínas de fusión Fc), proteínas de unión multivalentes (por ejemplo, DVD Ig), conjugados de anticuerpo y fármaco, vacunas, ácidos nucleicos, azúcares, formas recombinantes de los mismos, formas modificadas por ingeniería genética de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de productos biológicos basados en anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales de diagnóstico o terapéuticos y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende un fármaco anti-integrina, tal como un fármaco anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, vedolizumab (ENTYVIO™), etrolizumab) y/o un fármaco anti-integrina $\alpha 4\beta 1$ (por ejemplo, natalizumab (TYSABRI®)). En otras realizaciones, el anticuerpo comprende un fármaco anti-citocinas, tal como un fármaco anti-IL12p40 (por ejemplo, ustekinumab (STELARA®)). En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende un fármaco anti-receptor de citocinas, tal como un fármaco anti-receptor de IL-6 (por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®)). En otras realizaciones, el anticuerpo comprende un fármaco anti-receptor de CD tal como un fármaco anti-receptor de CD3 (por ejemplo, visilizumab), un fármaco anti-receptor de CD4 (por ejemplo, priliximab), un medicamento anti-receptor de CD20 (por ejemplo, rituximab (RITUXAN®), ofatumumab (ARZERRA®), obinutuzumab (GAZYVA®), ibritumomab tiuxetano (ZEVALIN®), tositumomab (BEXXAR®), ocrelizumab, veltuzumab, un medicamento anti-receptor de CD25 (por ejemplo, daclizumab (ZENAPAX®)) o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende un medicamento anti-TNF α , tal como infliximab (REMICADE®), adalimumab (HUMIRA®), etanercept (ENBREL®), golimumab (SIMPONI®), certolizumab pegol (CIMZIA®) o combinaciones de los mismos. Los ejemplos adicionales de compuestos biológicos basados en anticuerpos incluyen conjugados de anticuerpo-fármaco, tales como brentuximab vedotina (ADCETRIS®).

La tabla 1 proporciona una lista ejemplar y no exhaustiva de anticuerpos monoclonales de diagnóstico y terapéuticos que han sido aprobados o están actualmente en desarrollo. Se proporciona una lista extensa de medicinas biológicas que incluyen agentes terapéuticos y de diagnóstico a base de anticuerpos en desarrollo clínico y productos aprobados en el informe de PhRMA de 2006 titulado "418 Biotechnology Medicines in Testing Promise to Bolster the Arsenal Against Disease" y el informe de PhRMA de 2013 PhRMA titulado "Medicines in Development - Biologies".

TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
Trastornos digestivos		
ABT 874	Abbott Laboratories	Enfermedad de Crohn
AMG 139/MEDI-2070	Amgen	Enfermedad de Crohn
AMG 181/MEDI-7183	Amgen	Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
anrukizumab (IMA-638)	Pfizer	colitis ulcerosa
anti-IPIO	Bristol-Myers Squibb	Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
clazakizumab (anti-IL6)	Bristol-Myers Squibb, Alder Biopharmaceuticals	Enfermedad de Crohn

(continuación)

Nombre del producto	Compañía	Indicación
Trastornos digestivos		
etrolizumab (rhuMAB- β 7)	Genentech	colitis ulcerosa
GSK1070806 (IL-18 mAb)	GlaxoSmithKline	enfermedad inflamatoria del intestino
Humira® (adalimumab)	AbbVie	Enfermedad de Crohn
MDX-1100	Millennium Pharmaceuticals	colitis ulcerosa
Nuvion® (visilizumab)	PDL BioPharma	colitis ulcerosa resistente a esteroides I.V. y enfermedad de Crohn
PF-00547659	Pfizer	Enfermedad de Crohn
PF-04236921	Pfizer	Enfermedad de Crohn
QAX576	Novartis Pharmaceuticals	Enfermedad de Crohn
Remicade® (infliximab)	Janssen Biotech	Enfermedad de Crohn
SAR252067 (mAb antiLIGHT)	Sanofi US	Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
SAR339658 (antagonista de VLA2)	Sanofi US	enfermedad inflamatoria del intestino
Simponi® (golimumab)	Janssen Biotech	colitis ulcerosa
Stelara® (ustekinumab)	Janssen Biotech	Enfermedad de Crohn
tralokinumab	AstraZeneca, MedImmune	colitis ulcerosa
Tysabri® (natalizumab)	Biogen Idee	Enfermedad de Crohn
vedolizumab (MLN0002)	Takeda Pharmaceuticals	Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
Trastornos autoinmunes		
ABT-122	AbbVie	artritis reumatoide
Actemra® (tocilizumab)	Genentech, Roche	artritis reumatoide temprana, esclerosis sistémica
AGS-009	Argos Therapeutics	lupus eritematoso sistémico (LES)
alemtuzumab	Genzyme	esclerosis múltiple recurrente-remitente
AME 527	Applied Molecular	artritis reumatoide
AMG 108	Amgen	artritis reumatoide
AMG 557/MEDI-5872	Amgen, AstraZeneca, MedImmune	SLE
AMG 714	Amgen	artritis reumatoide
AMG 729	Amgen	enfermedades autoinmunitarias
AMG 811	Amgen	lupus discoide eritematoso, SLE
ART 874	Abbott Laboratories	esclerosis múltiple
mAb anti-CD 16	MacroGenics	trombocitopenico inmune
mAb anti-IL17 (RG7624)	Genentech	trastornos autoinmunes
anti-LINGO (BIIB033)	Biogen Idee	Esclerosis múltiple
Benlysta® (belimumab)	GlaxoSmithKline	artritis reumatoide, SLE, escleroderma sistémico
BI-695500 (biosimilar a rituximab)	Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals	artritis reumatoide
BI-695501 (biosimilar a adalimumab)	Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals	artritis reumatoide
BT-061	AbbVie, Biotest	artritis reumatoide
Cimzia® (certolizumab pegol)	UCB	espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil
clazakizumab (anti-IL6)	Bristol-Myers Squibb, Alder Biopharmaceuticals	artritis reumatoide
CNTO-136 (sirukumab)	Janssen Biotech	artritis reumatoide
CNTO-1959	Janssen Biotech	artritis reumatoide
daclizumab (mAb anti-CD25)	AbbVie, Biogen Idee	esclerosis múltiple

(continuación)

Trastornos autoinmunes		
epratuzumab	Immunomedics, UCB	SLE
ETI-201	Elusys Therapeutics	SLE
GSK1223249 (NOGO-A mAb)	GlaxoSmithKline	esclerosis múltiple
Humira® (adalimumab)	AbbVie	artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis
HuZAF® (fontolizumab)	PDL BioPharma, Biogen Idee	artritis reumatoide
Ilaris® (canakinumab)	Novartis Pharmaceuticals	artritis idiopática juvenil sistémica
IMMU-106 (hCD20)	Immunomedics	enfermedades autoinmunitarias
mavrilimumab	AstraZeneca, MedImmune	artritis reumatoide
MEDI-545 (MDX-1103)	Medarex, MedImmune	lupus
MEDI-546 (mAb anti-IFN-alphaR)	AstraZeneca, MedImmune	SLE
MEDI-551 (mAb anti-CD 19)	AstraZeneca, MedImmune	esclerodermia
MEDI-570 (mAb anti-ICOS)	AstraZeneca, MedImmune	SLE
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals	esclerosis múltiple
NN8209 (mAb anti-C5aR-151)	Novo Nordisk	artritis reumatoide
NN8210 (mAb anti-C5aR-215)	Novo Nordisk	artritis reumatoide
NN8226 (mAb anti-IL-20)	Novo Nordisk	artritis reumatoide
NN8765 (mAb anti-NKG2)	Novo Nordisk	artritis reumatoide
NN8828 (mAb anti-IL-21)	Novo Nordisk	artritis reumatoide
ocrelizumab (mAb anti-CD20)	Biogen Idec, Genentech, Roche	esclerosis múltiple, artritis reumatoide
ofatumumab	GlaxoSmithKline	esclerosis múltiple, artritis reumatoide
OKT3-gamma-1	Johnson & Johnson	artritis psoriásica
olokizumab	UCB	artritis reumatoide
otelixizumab (mAb anti-CD3)	GlaxoSmithKline	artritis reumatoide
ozoralizumab (ATN-103)	Abylynx	artritis reumatoide
pateclizumab (mAb anti-LT alfa)	Genentech	artritis reumatoide
PD-360324	Pfizer	lupus eritematoso cutáneo
PF-04236921	Pfizer	SLE, artritis reumatoide
PF-05280586 (biosimilar a rituximab)	Pfizer	artritis reumatoide
Prolia® (denosumab)	Amgen	artritis reumatoide
Remicade® (infliximab)	Janssen Biotech	artritis reumatoide
Rituxan® (rituximab)	Genentech, Biogen Idee	artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple progresiva primaria, SLE, esclerosis múltiple recurrente-remitente
rontalizumab (RG7415)	Genentech	SLE
SAN-300 (anticuerpo anti-VLA-1)	Santarus	artritis reumatoide
SARI 13244 (mAb anti-CXCR5)	Sanofi US	SLE
sarilumab (SAR153191)	Regeneron Pharmaceuticals, Sanofi US	artritis reumatoide
secukinumab (AIN457)	Novartis Pharmaceuticals	espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, esclerosis múltiple
sifalimumab (mAb anti-IFN-alfa)	AstraZeneca, MedImmune	SLE
Simponi® (golimumab)	Janssen Biotech	artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, sarcoidosis, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica
siplizumab (MEDI-507)	MedImmune	psoriasis
Soliris® (eculizumab)	Alexion Pharmaceuticals	miastenia grave severa o refractaria

(continuación)

Trastornos autoinmunes		
Stelara® (ustekinumab)	Janssen Biotech	artritis reumatoide, sarcoidosis, psoriasis en placas, esclerosis múltiple
tabalumab (inhibidor de BAFF)	Eli Lilly	SLE
TRX 1 (anti-CD4)	TolerRx	lupus eritematoso cutáneo
TRX 4	TolerRx	psoriasis
Tysabri® (natalizumab)	Biogen Idee	Esclerosis múltiple
veltuzumab (IMMU-106)	Immunomedics, Takeda Pharmaceuticals USA	púrpura trombocitopénica inmune, artritis reumatoide
VX15	Teva Pharmaceuticals, Vaccinex	esclerosis múltiple
XmAb®5871 (mAb anti-CD 19)	Xencor	trastornos autoinmunes
Trastornos musculoesqueléticos/artritis		
ABT-981	AbbVie	artrosis
AMG 167	Amgen	enfermedades óseas metabólicas
AMG 745	Amgen	atrofia muscular
AMG 827 (brodalumab)	AstraZeneca, Amgen	artritis psoriásica
blosozumab (LY2541546)	Eli Lilly	osteoporosis
BYM338	Novartis Pharmaceuticals	miositis esporádica por cuerpos de inclusión, atrofia muscular
Cimzia® (certolizumab pegol)	UCB	artritis psoriásica
clazakizumab (anti-IL6)	Bristol-Myers Squibb, Alder Biopharmaceuticals	artritis psoriásica
gevokizumab (mAb inhibidor de IL-1B)	XOMA	artrosis de la mano
Humira® (adalimumab)	AbbVie	espondiloartritis
Ilaris® (canakinumab)	Novartis Pharmaceuticals	artritis gotosa
ixekizumab (anticuerpo contra IL-17)	Eli Lilly	artritis psoriásica
LY2495655 (mAb anti-miostatina)	Eli Lilly	atrofia muscular por desuso
MCS110	Novartis Pharmaceuticals	sinovitis
Prolia® (denosumab)	Amgen	osteoporosis masculina, osteoporosis posmenopáusica
romosozumab (AMG 785)	Amgen	osteoporosis posmenopáusica
SAR391786 (REGN1033)	Regeneron Pharmaceuticals, Sanofi US	tratamiento de la atrofia muscular después de cirugía ortopédica
secukinumab (AIN 457)	Novartis Pharmaceuticals	artritis psoriásica, polimialgia reumática
Stelara® (ustekinumab)	Janssen Biotech	artritis psoriásica
tanezumab	Pfizer	artrosis
Cáncer y afecciones relacionadas		
1311-huA33	Life Science Pharmaceuticals	cáncer colorrectal
1D09C3	GPC Biotech	linfomas de linfocitos B recidivantes/refractarios
8H9 mAb	United Therapeutics	cáncer cerebral metastásico
212-Pb-TCMC-trastuzumab	AREVA Med	cáncer positivo para HER2 metastatizado en la región abdominal
AbGn-7	AbGenomics International	tumores sólidos
ABT-806	AbbVie	tumores sólidos
Actimab-A (M195 mAb)	Actinium Pharmaceuticals	leucemia mieloide aguda (AML)

(continuación)

Cáncer y afecciones relacionadas		
Adcetris® (brentuximab vedotina)	Seattle Genetics	linfoma cutáneo de linfocitos T, primera línea para linfoma de Hodgkin, prevención de la recidiva del linfoma de Hodgkin después de trasplante, linfoma no Hodgkin, neoplasias malignas distintas de linfoma, neoplasias malignas hematológicas positivas a CD30
AGS PSCA mAb	Agensys, Merck	cáncer de próstata
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
ALT-836	Altor BioScience, Genentech	cáncer
AME-133v	MENTRIK Biotech	linfoma no Hodgkin
AMG 102	Amgen	cáncer
AMG 479	Amgen	cáncer
AMG 623	Amgen	Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (CLL)
AMG 655	Amgen	cáncer
AMG 706	Amgen	GIST resistente a imatinib, cáncer de tiroides avanzado
AMG 780	Amgen	tumores sólidos
AMG 820	Amgen	tumores sólidos
AMG 888 (U3-1287)	Amgen	cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)
conjugado anticuerpo-fármaco (RG7600)	Genentech	cáncer de ovarios, cáncer de páncreas
ADC anti-CD22 (RG7593)	Genentech, Seattle Genetics	linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL)
mAb anti-CD23	Biogen Idee	CLL
mAb anti-CD45	Actinium Pharmaceuticals	LMA
ADC anti-CD79b (RG7596)	Genentech, Seattle Genetics	linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no Hodgkin,
	Genetics	CLL
mAb anti-CD80	Biogen Idee	linfoma no Hodgkin de linfocitos B
anti-CXCR4	Bristol-Myers Squibb	neoplasias malignas hematológicas
mAb anti-EGFL7 (RG7414)	Genentech	cáncer colorrectal metastásico, NSCLC, tumores sólidos
mAb anti-FGFR3 (RG7444)	Genentech	tumores sólidos
mAb anti-HER3/EGFR DAF (RG7597)	Genentech	cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello
vacuna contra el cáncer antiidiotípico	Viventia Biotech	melanoma maligno
mAb anti-receptor beta de linfotoxina	Biogen Idee	tumores sólidos
anti-PD-L1	Bristol-Myers Squibb	cáncer
mAb anti-PD-L1 (RG7446)	Genentech	melanoma, tumores sólidos
mAb anti-PEM	Somanta Pharmaceuticals	cáncer
ADC anti-STEAP1 (RG7450)	Genentech, Seattle Genetics	cáncer de próstata
anti-Tac(Fv)-E38 inmunotoxina	National Cancer Institute	leucemia, linfoma
APN301 (hu14.18-IL2)	Apeiron Biologics	melanoma maligno, neuroblastoma en niños

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Archexin™ (RX-0201)	Rexahn Pharmaceuticals	cáncer de páncreas
Arzerra® (ofatumumab)	GlaxoSmithKline	CLL, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular
ASG-5ME	Agensys, Seattle Genetics	cáncer de páncreas, cáncer de próstata resistente a la castración
ASG-22ME	Agensys, Seattle Genetics	tumores sólidos
AV-203	AVEO Oncology	tumores sólidos
Avastin® (bevacizumab)	Genentech, Roche	cáncer de ovarios, cáncer de mama negativo a HER-2, cáncer de mama positivo a HER-2, tumores carcinoides de alto riesgo, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios metastásico, NSCLC, cáncer colorrectal metastásico
mAb anti-CD33 cargado con AVE 9633 maitansina	Sanofi Aventis	LMA
bavituximab	Peregrine Pharmaceuticals	NSCLC, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata, adenocarcinoma rectal
BAX-69	Baxter International	tumores sólidos
BAY 79-4620	Bayer HealthCare Pharmaceuticals	tumores sólidos
BAY 94-9343	Bayer HealthCare Pharmaceuticals	tumores sólidos
BAY 20-10112	Amgen, Bayer HealthCare Pharmaceuticals	tumores sólidos
Bexxar® (tositumomab)	GlaxoSmithKline	linfoma no Hodgkin
BHQ880	Novartis Pharmaceuticals	mieloma múltiple
BI-505	BiolInvent International	mieloma múltiple
BI-836845	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	tumores sólidos
bivatuzumab	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	cáncer
blinatumomab	Amgen	leucemia y linfoma
BrevaRex™	ViRexx	cáncer de mama, mieloma múltiple
BT-062 (indatuximab ravtansina)	Biotest	mieloma múltiple
BYM338	Novartis Pharmaceuticals	caquexia relacionada con el cáncer
Campath® (alemtuzumab)	Berlex Laboratories, Genzyme	leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma
catumaxomab	Fresenius Biotech	ascitis maligna, cáncer de ovario
CAT 3888	Cambridge Antibody Technology	tricoleucemia
CDX-011 (glembatumumab vedotina)	Celldex Therapeutics	cáncer de mama, melanoma maligno
CDX-1127	Celldex Therapeutics	neoplasias malignas hematológicas, tumores sólidos
CEP-37250/KNK-2804	Teva North America, Kyowa Hakko Kirin Pharma	adenocarcinoma
ch14.18 mAb	United Therapeutics	neuroblastoma
mAb quimérico	National Cancer Institute	neuroblastoma
Cixutumumab (LY3012217)	Eli Lilly, Imclone Systems	NSCLC
CNTO-328 (siltuximab)	Janssen Biotech	hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes, mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos, cáncer de próstata, cáncer renal,
Cotara™ mAb TNT	Peregrine Pharmaceuticals	glioblastoma recurrente

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
CP-751871 (figitumumab)	Pfizer	carcinoma adrenocortical, cáncer de pulmón no microcítico
CS-1008 (tigatuzumab)	Daiichi Sankyo	cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario
mAb CSF-1R (IMC-CS4)	Eli Lilly	tumores sólidos
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
CT-011 (pidilizumab)	CureTech	AML, cáncer colorrectal, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, melanoma maligno
dalotuzumab (MK-0646)	Merck	cáncer de mama, tumores neuroendocrinos, NSCLC
daratumumab	Janssen Biotech	mieloma múltiple
DEDN6526A	Genentech	melanoma maligno
demcizumab (OMP-21M18)	GlaxoSmithKline, OncoMed Pharmaceuticals	tumores sólidos
DFRF4539A	Genentech	mieloma múltiple
DI17E6 (mAb anti-integrina)	EMD Serono	cáncer colorrectal, cáncer de próstata
DKN-01	Dekkun	tumores sólidos
ecromeximab (KW-2871)	Life Science Pharmaceuticals	melanoma metastásico
elotuzumab	Bristol-Myers Squibb, AbbVie	mieloma múltiple
EMD 273063	EMD Lexigen	tumores sólidos, melanoma maligno, neuroblastoma, SCLC
enavatuzumab	AbbVie	tumores sólidos
ensituximab (NPC-1C)	Neogenix Oncology	cáncer colorrectal, cáncer de páncreas
combinación de epratuzumab Y-90/veltuzumab	Immunomedics	linfoma no Hodgkin
Erbix® (cetuximab)	Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, ImClone Systems	cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
farletuzumab (MORAb-003)	Eisai	cáncer de ovario sensible al platino, NSCLC
FG-3019	FibroGen	cáncer de páncreas
ficlatuzumab	AVEO Oncology	glioblastoma, linfoma, mieloma múltiple, tumores sólidos
flanvotumab (proteína TYRP1)	Eli Lilly	melanoma maligno
Fzd7 (vantictumab)	Bayer HealthCare Pharmaceuticals, OncoMed Pharmaceuticals	tumores sólidos
ganitumab	Amgen	cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, sarcoma
GC-33/RG7686	Chugai Pharma USA, Roche	cáncer de hígado
GMK	Progenies Pharmaceuticals	prevención de la recurrencia después de la cirugía para extirpar el melanoma de primacía en pacientes de alto riesgo
GS-6624 (sintuzumab)	Gilead Sciences	cáncer colorrectal, cáncer de páncreas
HCD122 (mAb anti-CD40)	Novartis Pharmaceuticals, XOMA	linfoma
Herceptin® (trastuzumab)	Genentech	cáncer de mama en estadio temprano o metastásico que sobreexpresa HER2

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
HGS-ETR1 (mapatumumab)	GlaxoSmithKline	cáncer de hígado, mieloma múltiple, NSCLC, tumores hematológicos y sólidos
HGS-TR2J	Human Genome Sciences	tumores sólidos avanzados
HuC242-DM4	ImmunoGen	colorrectal, gastrointestinal, NSCLC, cánceres pancreáticos
HuL2G7	Galaxy Biotech	tumores sólidos
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
HuMax-CD4 (zanolimumab)	Genmab, Serono	linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma no cutáneo de linfocitos T
HuMax CD20 (ofatumumab)	Genmab	CLL, linfoma no Hodgkin
HuMax-EGFr	Genmab	cáncer de cabeza y cuello
HuM195/rGel	Targa Therapeutics	AML, CML, síndromes mielodisplásicos
huN901-DM1 (lorvotuzumab mertansina)	ImmunoGen	SCLC, mieloma múltiple, tumores sólidos
icrucumab (LY3012212)	Eli Lilly, ImClone Systems	cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal
IMC-TR1 (LY3022859)	Eli Lilly, ImClone Systems	tumores sólidos
IMGN529	ImmunoGen	linfoma no Hodgkin
IMGN853	ImmunoGen	tumores sólidos
IMMU-102 (epratuzumab Y-90)	Immunomedics	linfoma no Hodgkin
inotuzumab ozogamicina (CMC-544)	Pfizer, UCB	linfoma no Hodgkin agresivo, ALL
Iomab-B (mAb anti-CD45)	Actinium Pharmaceuticals	LMA
J 591 Lu-177	BZL Biologics	cáncer de próstata
KB004	KaloBios Pharmaceuticals	neoplasias malignas hematológicas
LFA102	Novartis Pharmaceuticals, XOMA	cáncer de mama, cáncer de próstata
lirilumab (anti-KIR)	Bristol-Myers Squibb	cáncer
LY2495655 (mAb anti miostatina)	Eli Lilly	caquexia por cáncer
LY2875358 (mAb c-met)	Eli Lilly	cáncer
conjugado de M195-bismuto 213	Actinium Pharmaceuticals	LMA
M200 (volociximab)	PDL BioPharma, Biogen Idee	tumores sólidos avanzados
MAB HeFi-1	National Cancer Institute	linfoma, linfoma no Hodgkin
MABp1	XBiotech	caquexia relacionada con el cáncer, cáncer avanzado, leucemia
MDX-060 (iratumumab)	Medarex	enfermedad de Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes
MDX-070	Medarex	cáncer de próstata
MDX-214	Medarex	cánceres que expresan EGFR
MEDI-522	MedImmune	linfoma de linfocitos T, melanoma, cáncer de próstata, tumores sólidos
MEDI-551 (mAb anti-CD19)	AstraZeneca, MedImmune	neoplasias malignas hematológicas
MEDI-573 (mAb anti-IGF)	AstraZeneca, MedImmune	tumores sólidos
MEDI-575 (mAb anti-PDGFR α)	AstraZeneca, MedImmune	glioblastoma, NSCLC
MEDI-0639 (mAb anti-DLL-4)	AstraZeneca, MedImmune	tumores sólidos
MEDI-3617 (mAb anti-ANG-2)	AstraZeneca, MedImmune	tumores sólidos
MEDI-4736 (mAb anti-CD274)	AstraZeneca, MedImmune	cáncer
MEDI-6469 (mAb anti-OX40)	AgonOx, AstraZeneca, MedImmune	tumores sólidos
MGA271 (anti-B7-H3)	MacroGenics	tumores sólidos

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
MGAH22 (anti-HER2)	MacroGenics	tumores sólidos
milatuzumab	Immunomedics	CLL
milatuzumab-DOX	Immunomedics	mieloma múltiple
MINT1526A	Genentech	tumores sólidos
MK-3475	Merck	melanoma maligno, NSCLC
MLN0264 (conjugado de anticuerpo-fármaco GCC)	Millennium Pharmaceuticals	cáncer gastrointestinal
mogamulizumab	Kyowa Hakko Kirin Pharma	linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma de linfocitos T en adultos, leucemia de linfocitos T
MORAb 003	Eisai	cáncer de ovario
MORAb-004	Eisai	cáncer colorrectal, melanoma, sarcoma
MORAb-009 (amatuximab)	Eisai	mesotelioma
moxetumomab pasudotox	AstraZeneca, MedImmune	neoplasias malignas hematológicas
Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicina)	Wyeth	leucemia mieloide aguda
necitumumab	Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, ImClone Systems	NSCLC
neuradiab	Bradmer Pharmaceuticals	glioblastoma
nimotuzumab	InnoMab PTE	glioma, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, glioma maligno recurrente o refractario de alto grado, astrocitomas anaplásicos, glioblastomas y glioma pontino intrínseco difuso
nivolumab (anti-PD 1)	Bristol-Myers Squibb	melanoma, NSCLC, carcinoma de células renales, tumores sólidos
obinutuzumab (GA101)	Biogen Idec, Genentech	CLL, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no Hodgkin
olaratumab (LY3012207)	Eli Lilly, ImClone Systems	glioblastoma
OMP-52M51 (antiNotch 1)	GlaxoSmithKline, OncoMed Pharmaceuticals	neoplasias malignas hematológicas
OMP-59R5 (anti-Notch 2/3)	GlaxoSmithKline, OncoMed Pharmaceuticals	cáncer de páncreas
onartuzumab (mAb anti-c-met)	Genentech	NSCLC metastásico
oregovomab	Quest Pharmatech	cáncer de ovario
PAM 4	Merck	cáncer de páncreas
panitumumab (rIIuMAb EGFr)	Abgenix	cáncer colorrectal
Perjeta™ (pertuzumab)	Genentech	cáncer de mama positivo a HER2 temprano, cáncer de mama metastásico positivo a HER2, cáncer de gástrico positivo a HER2, cáncer de ovario
PF-03446962	Pfizer	tumores sólidos
PF-04605412	Pfizer	tumores sólidos
PF-05082566	Pfizer	cáncer, linfoma
PF-05280014 (biosimilar de trastuzumab)	Pfizer	cáncer mama metastásico
PSMA-ADC	Progenies Pharmaceuticals	cáncer de próstata
R1550 RadioTheraCIM	Roche, YM BioSciences	cáncer de mama metastásico, glioma
ramucirumab (LY3009806)	Eli Lilly, ImClone Systems	cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
RAV 12	Raven Biotechnologies	cáncer
Redectane® (girentuximab I-124)	Wilex AG	diagnóstico de cáncer de riñón
REGN1400	Regeneron Pharmaceuticals	cáncer
Rencarex® G250	Wilex AG	cáncer renal
RG7116	Roche	tumores sólidos
RG7155	Roche	tumores sólidos
RG7160 (humAb EGFR)	Roche	cáncer colorrectal
RG7212	Roche	tumores sólidos
RG7356 (mAb anti-CD44)	Roche	AML, tumores sólidos
RG7458 (conjugado de anticuerpo-fármaco)	Genentech, Seattle Genetics	cáncer de ovario
RIGScan™	Navidea Biopharmaceuticals	diagnóstico de cáncer colorrectal
rilotumumab	Amgen	cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, SCLC
Rituxan® (rituximab)	Genentech	linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no Hodgkin de linfocitos B, terapia de inducción de linfoma no Hodgkin indolente, CLL recidivante o refractaria
RON8 mAb	Eli Lilly, ImClone Systems	cáncer
SAR3419 (mAb anti-CD19 cargado con maitansina)	Sanofi US	ALL, linfoma no Hodgkin
SAR153192 (REGN 421) (mAb anti-DLL4)	Regeneron Pharmaceuticals, Sanofi US	cáncer
SAR256212 (MM-121) (mAb anti-ErbB3)	Merrimack Pharmaceuticals, Sanofi US	cáncer de mama, tumores sólidos
SAR307746 (REGN910) (mAb anti-angiopoyetina-2)	Regeneron Pharmaceuticals, Sanofi US	tumores sólidos
SAR566658 (anti-DS6 cargado con maitansina)	Sanofi US	Tumores sólidos DS6 positivos
SAR650984 (mAb desnudo anti-CD38)	Sanofi US	neoplasias malignas hematológicas
SGN30	Seattle Genetics	linfoma anaplásico cutáneo de células grandes, linfoma anaplásico sistémico de células grandes, enfermedad de Hodgkin
SGN-33 (lintuzumab)	Seattle Genetics	AML, síndromes mielodisplásicos CLL mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin
SGN-40	Seattle Genetics	AML, síndromes mielodisplásicos CLL mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin
SGN-75 (vorsetuzumab mafodotina)	Seattle Genetics	linfoma no Hodgkin, cáncer renal
sibroturtumab	Life Science Pharmaceuticals	colorrectal, cabeza y cuello, cánceres de pulmón
Sym004	EMD Serono, Symphogen	cáncer de cabeza y cuello, tumores sólidos
tabalumab (inhibidor de BAFF)	Eli Lilly	mieloma múltiple
Tarvacin™ (bavituximab)	Peregrine Pharmaceuticals	tumores sólidos
TF2	Immunomedics	diagnóstico de cáncer colorrectal
TG-1101 (ublituximab)	TG Therapeutics	CLL, linfoma no Hodgkin

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
tigatuzumab	Daiichi Sankyo	cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas
TNX-650	Tanox	linfoma de Hodgkin refractario
trastuzumab emtansina (T-DM1)	Genentech, Roche	cáncer de mama metastásico positivo a HER2, cáncer de mama positivo a HER2 temprano, cáncer gástrico positivo a HER2 avanzado
TRC105	TRACON Pharmaceuticals	cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, tumores sólidos
tremelimumab (mAb anti-CTLA4)	AstraZeneca, MedImmune	tumores sólidos, melanoma metastásico, cáncer de próstata
mAb de inmunoterapia tumoral	Genentech	tumores sólidos
U3-1565	Daiichi Sankyo	tumores sólidos
urelumab (anti-CD137)	Bristol-Myers Squibb	cáncer
VAY736	MorphoSys, Novartis Pharmaceuticals	CLL
VB4-845	Viventia Biotechnologies	cáncer de vejiga
Vectibix® (panitumumab)	Amgen	cáncer colorrectal
mAb VEGFR3 (IMC-3C5)	Eli Lilly, ImClone Systems	cáncer
veltuzumab (IMMU-106)	Immunomedics	CLL, linfoma no Hodgkin
VGX-100	Circadian Technologies	tumores sólidos
volociximab	AbbVie	NSCLC
VX15	Vaccinex	tumores sólidos
Xgeva® (denosumab)	Amgen	retraso o prevención de metástasis óseas en cáncer de próstata o cáncer de mama, tumor de células gigantes del hueso
XmAb® (mAb de alta ADCC)	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Xencor	cáncer
XmAb® 2513 (mAb anti-CD30)	Xencor	enfermedad de Hodgkin, linfoma de linfocitos T
XmAb® 5574 (mAb anti-CD19)	MorphoSys, Xencor	CLL
Y-90 hPAM 4 (IMMU-107)	Immunomedics	cáncer de páncreas
Yervoy™ (ipilimumab)	Bristol-Myers Squibb	melanoma adyuvante, NSCLC, cáncer de próstata, SCLC, cáncer gástrico, cáncer de ovarios, leucemia, linfoma, cáncer de células renales
zanolimumab	Emergent BioSolutions	linfoma periférico de células T
Zevalin® (ibritumomab tiuxetano)	Spectrum Pharmaceuticals	linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no Hodgkin
Enfermedades infecciosas		
ABthrax™ (raxibacumab)	Human Genome Sciences	ántrax
Anthim™ (ETI-204)	Elusys Therapeutics	ántrax
inmunoglobulina contra el ántrax	Cangene	ántrax
mAb anti-HIV-1	Polymun Scientific	Infección por VIH
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
mAb anti-hsp90	NeuTec Pharma	candidiasis
anti-PD-L1	Bristol-Myers Squibb	hepatitis B

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
mAb anti-estafilococos	MedImmune	prevención de infecciones estafilocócicas
Aurexis (tefibazumab)	Inhibitex	prevención y tratamiento de la bacteriemia por <i>S. aureus</i>
bavituximab	Peregrine Pharmaceuticals	hepatitis C
mAb contra CCR5	Hunan Genome Sciences	Infección por VIH
Cytolin® (mAb anti-CD8)	CytoDyn	Infección por VIH
FGI-101-1A6	Functional Genetics	gripe
foravirumab	Crucell	prevención post-exposición a la rabia
ibalizumab (TMB-355)	TaiMed Biologics USA	Infección por VIH-1
KB001-A (producto de fragmento de anticuerpo)	KaloBios Pharmaceuticals, Sanofi Pasteur	Infecciones por <i>Pseudomonas</i> en pacientes con fibrosis quística, prevención de la neumonía asociada al ventilador
KD-247	Kaketsuken	Infección por VIH-1
MBL-HCV1	MassBiologics	Hepatitis C
MDX-066 (CDA-1)	Medarex	Enfermedad por <i>C. difficile</i>
MDX-1303	Medarex, PharmAthene	ántrax
MEDI-557 (mAb contra RSV de semivida prolongada)	AstraZeneca, MedImmune	prevención de infecciones por virus sincitial respiratorio (VSR)
MK-3415A (actoxumab/bezlotoxumab)	Merck	Infecciones por <i>Clostridium difficile</i>
NM01	SRD Pharmaceuticals	Infección por VIH
Numax™ (motavizumab)	MedImmune	VSR
PRO 140	CytoDyn	Infección por VIH-1
SAR279356 (mAb anti-PNAG)	Sanofi US	prevención de infecciones bacterianas
Soliris® (eculizumab)	Alexion Pharmaceuticals	síndrome urémico hemolítico relacionado con toxina Shiga de <i>E. coli</i> (STEC-HUS)
conjugado de vacuna estreptocócica B	Novartis Vaccines	prevención de infecciones estreptocócicas B
Synagis® (palivizumab)	MedImmune	prevención de infecciones por RSV
Tarvacin™	Peregrine Pharmaceuticals	hepatitis C
TCN-032 (mAb IgG)	Theraclone Sciences	infecciones por virus de la gripe A
TCN-202	Theraclone Sciences	Infecciones por CMV
Thraxiva™ (mAb completamente humano contra el ántrax)	Emergent BioSolutions	tratamiento post-exposición al ántrax
TNX-355	Tanox	Infección por VIH
UB-421	United Biomedical	Infección por VIH-1
XOMA 3AB	XOMA, National Institute of Allergy and Infectious Diseases	botulismo
XTL 6865	XTL Biopharmaceuticals	hepatitis C
Trastornos de la sangre		
afelimomab	Abbot Laboratories	septicemia, choque séptico
Benlysta® (belimumab)	GlaxoSmithKline	vasculitis
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
BI-655075	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	trastornos de la coagulación de la sangre

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
eculizumab	Alexion Pharmaceuticals	hemoglobinuria paroxística nocturna
mAb contra ferroportina	Eli Lilly	anemia
hepcidin mAb	Eli Lilly	anemia
ReoPro® (abciximab)	Eli Lilly	adyuvante para la intervención coronaria percutánea para la prevención de complicaciones isquémicas cardíacas
SelG1	Selexys Pharmaceuticals	anemia de células falciformes
urtoxazumab	Teijin Pharma	uremia hemolítica
Enfermedad cardiovascular		
AMG 145	Amgen	Hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia tipo IIa
mAb antifibrina (3B6/22 Tc-99m)	Agenix	diagnóstico de trombosis venosa profunda, diagnóstico de embolia pulmonar
anti-oxLDL (BI-204/RG7418)	BioInvent International, Genentech	ateroesclerosis
mAb anti-PCSK9 (RG7652)	Genentech	enfermedad cardiovascular
GSK249320	GlaxoSmithKline	ictus
anticuerpo contra IL-1β	Eli Lilly	enfermedad cardiovascular
Ilaris® (canakinumab)	Novartis Pharmaceuticals	prevención secundaria de eventos cardiovasculares
inclacumab (RG1512)	Roche	vasculopatía periférica
MABp1	XBiotech	reestenosis vascular
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals	ateroesclerosis
pexelizumab	Alexion Pharmaceuticals, Procter & Gamble Pharmaceuticals	infarto agudo de miocardio, derivación cardiopulmonar
PF-04950615 (RN316)	Pfizer	hipercolesterolemia
SAR236553/REGN727	Regeneron	hipercolesterolemia
(mAb anti-PCSK-9)	Pharmaceuticals, Sanofi US	
Diabetes y afecciones relacionadas		
mAb anti-CD3	MacroGenics	diabetes de tipo 1
gevokizumab (mAb inhibidor de IL-1B)	XOMA	diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2
GSK1070806 (IL-18 mAb)	GlaxoSmithKline	diabetes de tipo 2
Ilaris® (canakinumab)	Novartis Pharmaceuticals	diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2
MABp1	XBiotech	diabetes de tipo 2
OKT3-gamma-1	Johnson & Johnson	diabetes de tipo 1
teplizumab	MacroGenics	diabetes de tipo 1
TRX 4 (anti-CD3)	TolerRx	diabetes de tipo 1
Afecciones oculares		
anti-factor D (RG7417)	Genentech	atrofia geográfica asociada con la degeneración macular relacionada con la edad
anti-LINGO (BIIB033)	Biogen Idec	neuritis óptica
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
gevokizumab (mAb inhibidor de IL-1B)	XOMA	uveítis intermedia o posterior

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
GSK933776A (mAb anti-B amiloide)	GlaxoSmithKline	degeneración macular asociada a la edad
Humira® (adalimumab)	AbbVie	uveítis
iSONEP™ (sonepcizumab)	Lpath	degeneración macular relacionada con la edad húmeda
Lucentis® (ranibizumab)	Genentech, Roche	degeneración macular asociada a la edad
PF-04382923 (RN6G)	Pfizer	degeneración macular asociada a la edad
secukinumab (AIN457)	Alcon Labs, Novartis Pharmaceuticals	uveítis
Soliris® (eculizumab)	Alexion Pharmaceuticals	neuromielitis óptica grave o refractaria
Trastornos genéticos		
KRN-23	Kyowa Hakko Kirin Pharma	raquitismo hipofosfatémico dominante ligado al X
Soliris® (eculizumab)	Alexion Pharmaceuticals	hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)
Trastornos neurológicos		
AAB-002	Janssen Alzheimer Immunotherapy, Pfizer	enfermedad de Alzheimer
AAB-003/PF-05236812	Janssen Alzheimer Immunotherapy, Pfizer	enfermedad de Alzheimer
ABT-110	AbbVie	dolor crónico
ALD403	Alder Biopharmaceuticals	prevención de la migraña
ATI355 (mAb anti-Nogo-A)	Novartis Pharmaceuticals	lesión de la médula espinal
BAN2401 (inhibidor de la proteína beta amiloide)	BioArctic Neuroscience, Eisai	enfermedad de Alzheimer
bapineuzumab	Janssen Alzheimer Immunotherapy, Pfizer	enfermedad de Alzheimer
crenezumab (anti-Abeta)	Genentech	enfermedad de Alzheimer
fulranumab	Janssen Research & Development	dolor por cáncer
GSK1223249 (NOGO-A mAb)	GlaxoSmithKline	esclerosis lateral amiotrófica (ELA)
GSK933776A (mAb anti-B amiloide)	GlaxoSmithKline	enfermedad de Alzheimer
LY2951742 (péptido CGRP)	Arteaus Therapeutics, Eli Lilly	prevención de migraña
MEDI-5117 (mAb anti-IL-6)	AstraZeneca, MedImmune	dolor por artrosis
RG1450 (gantenerumab)	Roche	enfermedad de Alzheimer prodrómica
RN-307 (mAb anti-CGRP)	Labrys Biologics	migraña
RN624	Rinat Neuroscience	dolor por artrosis
RN1219	Rinat Neuroscience	enfermedad de Alzheimer
SAR228810 (mAb antiprototofibrilar AB)	Sanofi US	enfermedad de Alzheimer
solanezumab (LY2062430)	Eli Lilly	enfermedad de Alzheimer
tanezumab	Pfizer	dolor crónico
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
Trastornos respiratorios		
ABN912	Novartis Pharmaceuticals	asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
ABX-IL8	Amgen	EPOC

(continuación)

Trastornos respiratorios		
ALT-836	Altor BioScience, Genentech	lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria del adulto
AMG 157/MEDI-9929	Amgen, AstraZeneca	asma
AMG 317	Amgen	asma
AMG 761	Amgen	asma
AMG 827 (brodalumab)	Amgen, AstraZeneca	asma
benralizumab	AstraZeneca, MedImmune	asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
Bosatria™ (mepolizumab)	GlaxoSmithKline	asma
carlumab	Janssen Biotech	fibrosis pulmonar
CNTO-3157	Janssen Biotech	asma
CNTO-5825	Janssen Biotech	asma alérgica
daclizumab (mAb anti-CD25)	Protein Design Labs, Roche	asma
FG-3019	FibroGen	fibrosis pulmonar idiopática
GS-6624 (sintuzumab)	Gilead Sciences	fibrosis pulmonar idiopática
KB003	KaloBios Pharmaceuticals	asma grave
MEDI-528 (mAb anti-TL-9)	MedImmune	asma
MEDI-4212 (mAb anti-IgE)	AstraZeneca, MedImmune	asma
MEDI-7814 (mAb anti-C5/C5a)	AstraZeneca, MedImmune	EPOC
MEDI-8968 (mAb anti-IL-1R)	AstraZeneca, MedImmune	EPOC
mepolizumab (mAb anti-TL5)	GlaxoSmithKline	asma y poliposis nasal
QAX576	Novartis Pharmaceuticals	asma, fibrosis pulmonar idiopática
QBX258	Novartis Pharmaceuticals	asma
QGE031	Novartis Pharmaceuticals	asma alérgica
quilizumab (mAb anti-M1 prime)	Genentech	asma alérgica, rinitis alérgica
reslizumab	Cephalon	asma, esofagitis eosinófila
RG3637 (lebrikizumab)	Genentech, Roche	asma grave
SAR156597 (mAb biespecífico contra interleucina-4/interleucina-13)	Sanofi US	fibrosis pulmonar idiopática
SAR231893 (mAb anti-IL4)	Regeneron Pharmaceuticals, Sanofi US	asma
STX-100	Biogen Idec	fibrosis pulmonar idiopática
TNX-832	Tanox	enfermedades respiratorias
tralokinumab	AstraZeneca, MedImmune	asma
Xolair® (omalizumab)	Genentech, Novartis Pharmaceuticals	asma pediátrica
Enfermedades cutáneas		
AbGn-168H	AbGenomics International	psoriasis en placas
AMG 827 (brodalumab)	Amgen, AstraZeneca	psoriasis
BT-061	AbbVie, Biotest	psoriasis en placas
CNTO-1959	Janssen Biotech	psoriasis en placas
gevokizumab (mAb inhibidor de IL-1B)	XOMA	acné común
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
Humira® (adalimumab)	AbbVie	hidradenitis supurativa
ixekizumab (anticuerpo contra IL-17)	Eli Lilly	psoriasis
MABp1	XBiotech	acné, psoriasis

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
MK-3222 (tildrakizumab)	Merck	psoriasis en placas
QGE031	Novartis Pharmaceuticals	dermatitis atópica
REGN846	Regeneron Pharmaceuticals	dermatitis atópica
SAR231893 (mAb anti-IL4)	Regeneron Pharmaceuticals, Sanofi US	dermatitis atópica
secukinumab (AIN457)	Novartis Pharmaceuticals	psoriasis en placas
Xolair® (omalizumab)	Genentech, Novartis Pharmaceuticals	urticaria idiopática crónica
Trasplantes		
ASKP-1240	Astellas Pharma US, Kyowa Hakko Kirin Pharma	prevención del rechazo de trasplantes de órganos
Benlysta® (belimumab)	GlaxoSmithKline	inmunosupresión
ORTHOCLONE OKT® 3 (muromomab-CD3)	Ortho Biotech	rechazo agudo de trasplante renal, reversión de rechazo de trasplante de corazón e hígado
OKT3-gamma-1	Protein Design Labs, Johnson & Johnson	rechazo de trasplante renal
Simulect® (basiliximab)	Novartis Pharmaceuticals	prevención del rechazo de trasplante renal
Soliris® (eculizumab)	Alexion Pharmaceuticals	trasplante renal presensibilizado (rechazo humoral agudo)
TOL101	Tolera Therapeutics	prevención del rechazo del trasplante
Zenapax® (daclizumab)	Roche	profilaxis del rechazo agudo de trasplante renal
Otros		
anti-IL31	Bristol-Myers Squibb	inmunología
anti-TWEAK (BIIB 023)	Biogen Idec	nefritis por lupus
BAX-69	Baxter International	nefritis por lupus
CNTO-5	Janssen Biotech, MorphoSys	inflamación
CNTO-136 (sirukumab)	Janssen Biotech	nefritis por lupus
CR 0002	CuraGen	inflamación del riñón
FB 301	Cytovance Biologies, Fountain Biopharma	hipersensibilidad (enfermedades alérgicas mediadas por IgE)
FG-3019	FibroGen	fibrosis hepática por infección crónica de hepatitis B
fresolimumab (antagonista de TGFβ)	Genzyme	fibrosis
GS-6624 (sintuzumab)	Gilead Sciences	fibrosis hepática, mielofibrosis
GSK1070806 (mAb anti-interleucina 18)	GlaxoSmithKline	trastornos metabólicos
Humira® (adalimumab)	AbbVie	cistitis intersticial
LY2382770 (anticuerpo contra TGF-β)	Eli Lilly	nefropatía diabética
mAb	Genentech	trastornos metabólicos
mepolizumab (mAb anti-IL5)	GlaxoSmithKline	síndrome hipereosinófilo, esofagitis eosinofílica
TABLA 1		
Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Nombre del producto	Compañía	Indicación
Meth-mAb	InterveXion Therapeutics	abuso de metanfetaminas
Stelara® (ustekinumab)	Janssen Biotech	cirrosis biliar primaria
VAY736	MorphoSys, Novartis Pharmaceuticals	inflamación

(continuación)

Anticuerpos monoclonales (mAb)		
Xolair® (omalizumab)	Genentech, Tanox	alergia al cacahuete

5 Los ejemplos no limitantes de agentes biológicos a base de proteínas o a base de polipéptidos incluyen citocinas (por ejemplo, interleucinas), quimiocinas, factores de crecimiento, proteínas estimulantes de la producción de sangre (por ejemplo, eritropoyetina), hormonas (por ejemplo, Elonva® (hormona estimulante del folículo), hormona del crecimiento), enzimas (por ejemplo, Pulmozyme® (dornasa alfa)), factores de coagulación, insulina, albúmina, fragmentos de los mismos, variantes modificadas conservativamente de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

10 Los ejemplos de citocinas incluyen, pero sin limitación, TNF α , inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), osteoprotegerina (OPG), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , interleucinas (por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, receptor de IL-6 soluble (sIL-6R), IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-27), adipocitocinas (por ejemplo, leptina, adiponectina, resistina, inhibidor-1 de activador de plasminógeno activo o total (PAI-1), visfatina y proteína 4 de unión a retinol (RBP4)) y combinaciones de los mismos.

15 En realizaciones particulares, la interleucina comprende IL-2, tal como Proleukin® (aldesleucina; IL-2 recombinante).

20 Los ejemplos de quimiocinas incluyen, pero sin limitación, CXCL1/GRO1/GRO α , CXCL2/GRO2, CXCL3/GRO3, CXCL4/PF-4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRACK, CXCL15, CXCL16, CXCL17/DMC, CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/CCL10, CCL11/Eotaxina, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/MIP-5, CCL16/IEC, CCL17/TARC, CCL18/MIP-4, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MIP1, CCL24/Eotaxina-2, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxina-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CL1, CL2, CX₃CL1 y combinaciones de las mismas.

25 Los ejemplos no limitantes de factores de crecimiento incluyen factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF; también conocido como SERPINF1), anfirregulina (AREG; también conocido como factor de crecimiento derivado de schwannoma (SDGF)), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante-a (TGF- α), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, etc.), endotelina-1 (ET-1), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF; también conocido como FGF7), proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP1-BMP15), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento nervioso- β (β -NGF), factores neurotróficos (por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4), etc.), factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), miostatina (GDF-8), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y combinaciones de los mismos.

30

35

40 Los ejemplos de productos biológicos basados en construcciones de receptores o basados en proteínas de fusión incluyen, pero sin limitación, receptores de origen natural vinculados a un marco de inmunoglobulina (por ejemplo, Orenicia® (abatacept; proteína de fusión de inmunoglobulina-CTLA-4), Amevive® (alefacept; Proteínas de fusión IgG1, ENBREL® (etanercept; proteína de fusión del receptor de TNF humano recombinante), proteínas modificadas por ingeniería genética que combinan dos especies de polipéptidos diferentes (por ejemplo, Ontak® (denileukin diftotox; proteínas modificadas por ingeniería genética que comprenden interleucina-2 y toxina diftérica) y combinaciones de las mismas.

45

Por lo tanto, la presente invención se puede usar en métodos para detectar y medir la presencia o el nivel de un agente biológico en una muestra de un sujeto que recibe terapia biológica para una o más de las enfermedades o trastornos a los que se hace referencia en el presente documento y en la tabla 1, incluyendo uno o más de los siguientes:

50 Enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU)), uveítis, sarcoidosis, granulomatosis de Wegener y otras enfermedades con inflamación como característica central;

55 enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), espondilitis anquilosante (enfermedad de Bechterew), lupus, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, psoriasis, eritematoso y enfermedad celiaca;

60 Cáncer, tales como cánceres digestivos y gastrointestinales (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado (intestino delgado); tumores estromales gastrointestinales, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, cáncer gástrico (de estómago); cáncer de esófago; cáncer del apéndice; y similares); cáncer de vesícula biliar; cáncer de hígado; cáncer de páncreas; cáncer de mama; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico); cáncer de próstata; cáncer de ovarios; cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales); tumores del sistema nervioso central; cáncer de piel;

coriocarcinomas; cánceres de cabeza y cuello; neoplasias hematológicas (por ejemplo, leucemia, linfoma, como el linfoma no Hodgkin de linfocitos B); sarcomas osteogénicos (por ejemplo, sarcoma de Ewing); sarcomas de tejidos blandos (por ejemplo, dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP), rhabdomyosarcoma); otras neoplasias malignas de tejidos blandos y carcinomas papilares de tiroides;

5 enfermedades infecciosas, tales como enfermedad por *C. difficile*, virus sincitial respiratorio (VSR), VIH, ántrax, candidiasis, infecciones estafilocócicas y hepatitis C;

10 Trastornos de la sangre, tales como septicemia, choque séptico, hemoglobinuria paroxística nocturna y síndrome urémico hemolítico;

Enfermedad cardiovascular, tal como aterosclerosis, infarto agudo de miocardio, derivación cardiopulmonar y angina;

15 Trastornos metabólicos, tales como diabetes, por ejemplo, diabetes mellitus tipo 1 y diabetes tipo 2;

Trastornos genéticos, tales como hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN);

20 Trastornos neurológicos, tales como dolor por artrosis y enfermedad de Alzheimer;

Trastornos respiratorios, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), poliposis nasal y asma pediátrica;

25 Enfermedades cutáneas, tales como psoriasis, incluyendo psoriasis crónica en placas de moderada a grave;

Rechazo de trasplantes, tales como el rechazo agudo de trasplante renal, reversión de rechazo de trasplante de corazón e hígado, prevención del rechazo al trasplante renal, profilaxis del rechazo agudo de trasplante renal y rechazo de trasplante renal; y/o

30 Otros trastornos, tales como inflamación del riñón, osteoporosis posmenopáusica (trastornos óseos), síndrome hipereosinófilo, esofagitis eosinofílica y alergia al cacahuete.

35 En realizaciones particulares, el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, enfermedad intestinal inflamatoria (EII) como la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU)) o una enfermedad autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide).

VIII. Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, y no pretenden de modo alguno limitar la invención. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para proporcionar esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1

45 Este ejemplo ilustra la validación de un ensayo de cambio de movilidad homogéneo (HMSA) para la medición de vedolizumab (VLM) y anticuerpos anti-VLM (ATV) en suero de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

50 Vedolizumab (VLM), un antagonista de integrina $\alpha 4\beta 7$, es un anticuerpo monoclonal terapéutico recientemente aprobado para su uso en pacientes con colitis ulcerosa de moderada a grave o pacientes con enfermedad de Crohn que no han demostrado una respuesta adecuada a las terapias convencionales o a antagonistas de TNF alfa. La integrina $\alpha 4\beta 7$ es una glucoproteína heterodimérica específica para el intestino que es importante para la formación de leucocitos en sitios de inflamación en el intestino, a través de su interacción con molécula de adhesión celular de la addressina de la mucosa-1 (MadCam-1) expresada en el endotelio vascular intestinal. Se hace necesaria la disponibilidad de pruebas diagnósticas para medir con precisión los niveles farmacológicos de VLM y de anticuerpos anti-VLM para el uso eficaz de este nuevo agente terapéutico en pacientes con EII. En sucesión con nuestros ensayos de monitoreo de fármacos terapéuticos anti-TNF alfa, ahora hemos desarrollado y validado ensayos para medir los niveles de VLM y anti-VLM en el suero del paciente.

Métodos

60 El heterodímero de la proteína $\alpha 4\beta 7$ soluble se expresó y purificó a partir de células de mamíferos (por ejemplo, células CHO). En particular, la subunidad de la integrina $\alpha 4$ se truncó después del dominio thigh ($\alpha 4\Delta 620$) y la integrina $\beta 7$ después del dominio I-EGF 1 ($\beta 7\Delta 527$) (véase la figura 13). Los péptidos de bucle superenrollado α helicoidales ácidos/básicos que contienen un resto de Cys formador de puentes disulfuro se unieron al extremo C-terminal de las subunidades para estabilizar el heterodímero (Takagi et al., Embo J., 18:4607-4615 (2003); O'Shea et al., Curr. Biol., 3:658-667 (1993)). Se fusionó un marcador de hexahistidina al extremo C-terminal del péptido básico para facilitar la

purificación. Este heterodímero recombinante se utilizó en un formato de ensayo de movilidad homogéneo basado en "competición" (HMSA) para medir los niveles de VLM en sueros de pacientes en terapia con VLM. El suero del paciente se combinó con $\alpha 4\beta 7$ para permitir que el VLM terapéutico se uniera con $\alpha 4\beta 7$. Posteriormente, el VLM marcado de forma fluorescente compitió con VLM no marcado en sueros de pacientes para unirse a su diana, $\alpha 4\beta 7$ seguido de separación en cromatografía HPLC de exclusión por tamaños. La cantidad de VLM-alexa fluor "libre" determinó los niveles de VLM en sueros de pacientes. Para el ensayo anti-VLM, se crearon curvas patrón incubando suero humano normal que contenía cantidades conocidas de anticuerpos anti-VLM de conejo con VLM marcado con fluorescencia; los VLM unidos y libres se separaron luego por SEC-HPLC. La validación del método se determinó de acuerdo con las recomendaciones de la industria.

Resultados

La sensibilidad para VLM fue de 0,35 $\mu\text{g/ml}$. Se determinó que los límites inferior y superior de cuantificación (LLOQ y ULOQ) son de 0,625 $\mu\text{g/ml}$ y 14 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para anti-VLM, el LLOQ y el ULOQ fueron 3,13 U/ml y 150 U/ml, respectivamente. Las curvas patrón generadas para cada ensayo mostraron una alta reproducibilidad y sensibilidad. La precisión inter e intraensayo mostró menos del 10 % de CV y la exactitud estuvo dentro del 20 %. No hubo una interferencia significativa de sueros lipémicos, hemolizados o con factor reumatoide (Rf). Véanse las figuras 4-10.

Conclusiones

Se ha desarrollado y validado un ensayo sensible y específico para medir los niveles de VLM y anti-VLM en pacientes sometidos a tratamiento para la EII. El formato de ensayo requería un enfoque único debido a la complejidad de un gran antígeno heterodimérico unido a la membrana muy glicosilado como diana del fármaco. Los ensayos tanto de fármaco como anti-fármaco demuestran una alta exactitud y precisión con una alta sensibilidad y una alta tolerancia a agentes de interferencia conocidos. Los ensayos se usan para la monitorización clínica y la optimización farmacológica en pacientes individuales.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la validación de un ensayo homogéneo de cambio de movilidad (HMSA) y para la medición de ustekinumab (UTK) y anticuerpos contra ustekinumab (ATU) en el suero de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Ustekinumab es un anticuerpo monoclonal terapéutico que tiene una utilidad potencial en el tratamiento de la EII en pacientes que no han respondido a terapias convencionales o a antagonistas de TNF alfa. Ustekinumab es un anticuerpo monoclonal con especificidad para la interleucina 12 y la interleucina 23 a través de su subunidad p40 común y bloquea la inflamación a través de estas vías. Aquí describimos la validación analítica de un ensayo de cambio de alta movilidad basado en HPLC para medir UTK así como los anticuerpos contra ustekinumab.

Métodos

Se expresó la subunidad de IL12p40 recombinante soluble (por ejemplo, SEQ ID NO: 7) y se purificó a partir de células de mamífero. El ensayo aprovecha el UTK marcado con fluorescencia que compite con el UTK no marcado en sueros de pacientes para unirse a IL12p40. Después de la incubación de sueros de pacientes con IL12p40 recombinante, se añadió UTK-alexa fluor 488, antes de ejecutar muestras en una columna de HPLC de exclusión por tamaños que separa UTK-alexa fluor 488 "libre" de UTK-alexa fluor 488 que está unido a IL12p40. La cantidad de UTK-alexa fluor 488 "libre" es una medida de la cantidad de UTK terapéutico en los sueros de pacientes. El área bajo la curva (ABC) del UTK-alexa fluor 488 "libre" se representa contra el logaritmo de la concentración de UTK en muestras patrón conocidas y la concentración de UTK en los sueros de pacientes se calcula por interpolación. Para el ensayo de ATU, se crearon curvas patrón incubando suero humano normal que contenía cantidades conocidas de ATU de conejo con UTK marcado con fluorescencia; los GLM unidos y libres se separaron luego por SEC-HPLC. La validación del método se determinó de acuerdo con las recomendaciones de la industria.

Resultados

La sensibilidad para UTK fue de 0,15 $\mu\text{g/ml}$. Se determinó que el límite superior de cuantificación (ULOQ) era 8 $\mu\text{g/ml}$ y se determinó que el límite inferior de cuantificación (LLOQ) era 0,625 $\mu\text{g/ml}$. Para ATU, el LLOQ y el ULOQ fueron 3,13 U/ml y 150 U/ml, respectivamente. Las curvas patrón generadas para cada ensayo mostraron una alta reproducibilidad y sensibilidad. La precisión inter e intraensayo mostró menos del 10 % de CV y la exactitud estuvo dentro del 20 %. No hubo una interferencia significativa de sueros lipémicos, hemolizados o con factor reumatoide (Rf). Véanse las figuras 11-12.

Conclusiones

Este estudio describe la validación de un nuevo ensayo basado en "competencia" para medir los niveles de

ustekinumab en pacientes sometidos a tratamiento para la EII. El formato de ensayo requería un enfoque único debido a la complejidad de trabajar con este antígeno, debido a su tendencia a formar homodímeros y heterodímeros en suero, lo que dificulta el uso de un ensayo de HMSA convencional.

- 5 El ensayo HMSA basado en la competencia mostró alta exactitud y precisión con alta sensibilidad. Además, el ensayo tiene una alta tolerancia a los agentes de interferencia conocidos. Estos ensayos se usan para la monitorización clínica y la optimización farmacológica en pacientes individuales.

Ejemplo 3

10 Este ejemplo ilustra una metodología de ensayo basada en la competencia de vedolizumab (VLM) de la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que la metodología de ensayo descrita en este ejemplo es aplicable para determinar la presencia o el nivel de ustekinumab (UTK), así como otros productos biológicos en una muestra en situaciones en las que la complejidad de trabajar con el antígeno que se une al agente biológico (por ejemplo, el
15 antígeno es una proteína unida a la membrana, una proteína glucosilada, una proteína multimérica, una proteína insoluble, una proteína que es difícil de expresar o purificar y/o una proteína grande) necesita el uso de una forma soluble (por ejemplo, un fragmento soluble, variante, o monómero) del antígeno.

20 Las muestras de suero humano normal (NHS) enriquecidas con cantidades conocidas de vedolizumab (VLM) se diluyen en serie. Se diluyen diluciones seriadas de factor dos a partir de 80 µg/ml de VLM en NHS para formar una curva de 10 puntos (es decir, de 80 µg/ml a 0,15625 µg/ml). Se usó como controles positivos NHS enriquecido con 12, 4 y 1 µg/ml de VLM. Se añadieron a una placa de 96 pocillos muestras patrón de suero, controles positivos y muestras de pacientes. Las muestras de pacientes se agregan sin diluir o diluidas a 4x u 8x en NHS para aumentar el intervalo dinámico del ensayo. Se añaden el antígeno α4β7 soluble y el diluyente de ensayo. La placa se coloca en un agitador
25 y se deja incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de 1 hora, se agrega VLM marcado (por ejemplo, VLM-Alexa Fluor® 488). La placa se coloca de nuevo en un agitador para una incubación de 1 hora. Las muestras se filtran usando una placa de filtro de 0,2 µm. Las muestras se cargan en un inyector automático de HPLC y se ejecutan secuencialmente a través de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, una columna Phenomenex BioSep-SEC-s3000) que separa el VLM marcado libre (por ejemplo, VLM-Alexa Fluor® 488) del VLM
30 marcado unido al soluble Antígeno α4β7.

Se usa software escrito en lenguaje de programación R para identificar el pico que representa el VLM marcado libre (por ejemplo, VLM-Alexa Fluor® 488) y para determinar el área del pico. El área de este pico aumenta cuando hay VLM en los sueros del paciente. Al comparar el tamaño de este pico con la curva patrón, se pueden interpolar los
35 niveles de VLM del paciente.

Se utiliza Prism (por ejemplo, GraphPad Prism 6) para generar una curva patrón trazando el área de VLM marcado libre (por ejemplo, VLM-Alexa Fluor® 488) en función de los niveles séricos de VLM. Al comparar el tamaño de este pico con la curva patrón, se puede interpolar la concentración de fármaco VLM del paciente.
40

El ensayo descrito en este ejemplo se basa en la competencia entre el VLM en una muestra de un paciente que recibe terapia con VLM y el VLM marcado agregado a la muestra de reacción para unirse al antígeno soluble α4β7. Las relaciones relativas de VLM marcado y no marcado determinan la cantidad de antígeno α4β7 que se une a cada uno y determina el área del pico de VLM libre (por ejemplo, VLM-Alexa Fluor® 488). Cuanto más fármaco esté presente
45 en la muestra del paciente, más cantidad de VLM marcado permanecerá libre, en contraposición con el unido al antígeno α4β7.

Ejemplo 4

50 Este ejemplo ilustra la validación de un ensayo de cambio de movilidad homogéneo (HMSA) para la medición de vedolizumab (VLM) y anticuerpos anti-VLM en suero de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Antecedentes y objetivos

55 Vedolizumab, un antagonista de integrina α4β7, es un anticuerpo monoclonal terapéutico recientemente aprobado para su uso en pacientes con colitis ulcerosa de moderada a grave y pacientes con enfermedad de Crohn que no han demostrado una respuesta adecuada a las terapias convencionales o antagonistas de TNFα. La disponibilidad de pruebas de diagnóstico para medir con precisión los niveles séricos de VLM y anti-VLM (ATV) es necesaria para el uso eficaz de este nuevo agente terapéutico en pacientes con EII. Aquí se describe la validación analítica del HMSA desarrollado para medir los niveles de VDM y ATV en el suero del paciente, así como su utilidad clínica.
60

Métodos

65 Se expresó heterodímero α4β7 soluble (por ejemplo, heterodímero α4Δ620/β7Δ527; véase la figura 13) y se purificó en células de mamífero. Este heterodímero recombinante se usó en un formato HMSA basado en "competición" para medir los niveles séricos de VLM en pacientes en terapia VLM. El suero del paciente se combinó con α4β7 para

- 5 permitir que el VLM terapéutico se uniera con $\alpha 4\beta 7$. Posteriormente, el VLM marcado de forma fluorescente compitió con VLM no marcado en sueros de pacientes para unirse a su diana, $\alpha 4\beta 7$, seguido de separación en cromatografía HPLC de exclusión por tamaños (véase la figura 1). Para el ensayo anti-VLM, se crearon curvas patrón incubando suero humano normal que contenía cantidades conocidas de anticuerpos anti-VLM de conejo con VLM marcado con fluorescencia; los VLM unidos y libres se separaron luego por SEC-HPLC. La validación se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la industria (Shankar, G., et al. 2008).

Resultados

- 10 Los ensayos VLM y ATV muestran una alta precisión y exactitud intraensayo. La precisión intraensayo es inferior al 10 % y la precisión intraensayo es inferior al 15 % de error. La variabilidad entre ejecuciones, instrumentos y analista son menores del 15 % de CV y menores del 20 % de error en prácticamente todos los casos. (Tabla 2). La sensibilidad para VLM fue de 0,348 $\mu\text{g/ml}$ con un intervalo dinámico de 0,625-14 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 3). El límite de detección para el ensayo ATV es $<1,56$ U/ml. No se pudo determinar un valor preciso ya que es demasiado bajo para interpolar nuestra
- 15 curva. El intervalo dinámico para ATV fue de 3,13-150 U/ml en suero no diluido (tabla 3). El suero humano normal enriquecido con VLM o ATV mostró buena linealidad y recuperación a través de diluciones en serie (figura 14). El ATV muestra una alta tolerancia al fármaco a niveles de 20 $\mu\text{g/ml}$ de VLM (tabla 4). Los agentes de interferencia comunes en el suero del paciente se probaron y no interfirieron en los niveles observados en pacientes con EII (figura 15).

Tabla 2. Datos de validación para la exactitud y precisión de los ensayos.

Exactitud y precisión del VLM-HMSA		Precisión intraensayo												Precisión interensayo											
		(n=10)						(n=10)						(n=5)						(n=10)					
		Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja			
Esperado (µ/ml)	12	4	1	12	4	1	12	4	1	12	4	1	12	4	1	12	4	1	12	4	1				
Medido (Media, U/ml)	10,34	4,36	0,89	11,22	4,16	1,13	10,51	4,19	1,05	12,30	4,18	1,29	0,56	0,21	0,10	1,11	0,17	0,18	0,47	0,33	0,16				
DT	5,45	4,82	11,64	9,87	4,07	14,53	4,46	7,97	14,91	6,97	4,44	6,07	13,83	9,07	11,00	6,48	3,91	12,72	12,44	4,76	5,30				
% de error	13,83	9,07	11,00	6,48	3,91	12,72	12,44	4,76	5,30	2,46	4,44	6,07	29,04	29,04	29,04	2,46	4,44	4,44	2,46	4,44	4,44	29,04			
Exactitud y precisión del ATV-HMSA																									
Exactitud y precisión del ATV-HMSA		Precisión intraensayo												Precisión interensayo											
		(n=10)						(n=10)						(n=10)						(n=10)					
		Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja			
Esperado (U/ml)	50	25	12,5	50	25	12,5	50	25	12,5	50	25	12,5	50	25	12,5	50	25	12,5	50	25	12,5				
Medido (Media, U/ml)	47,31	23,32	11,72	51,53	25,01	13,54	51,52	25,56	13,51	47,31	23,34	11,75	2,82	1,51	0,79	1,76	5,00	2,43	1,86	2,73	1,46				
DT	5,96	6,46	6,75	9,71	13,56	13,00	9,71	9,52	13,78	5,77	6,25	6,62	5,37	6,71	6,27	7,93	0,04	8,32	3,04	2,25	8,06				
% de error	5,37	6,71	6,27	7,93	0,04	8,32	3,04	2,25	8,06	5,38	6,65	5,96	5,37	6,71	6,27	7,93	0,04	8,32	3,04	2,25	8,06				

Tabla 3. Límites de cuantificación para cada ensayo.

Ensayo	Límite de blanco	Límite de detección	Límite inferior de cuantificación	Límite superior de cuantificación
VLM-HMSA	n=30	n=30	n=36	n=36
	0,054 µg/ml	0,348 µg/ml	0,625 µg/ml	14 µg/ml
ATV-HMSA	n=25	n=25	n=36	n=36
	<1,56U/ml	<1,56U/ml	3.13U/ml	150U/ml

Tabla 4. Interferencia farmacológica en el ensayo anti-VLM.

Vedo [µg/ml]	ATV total [U/ml]
20	51,6
0	49,2
20	26,4
0	24,8
20	13
0	14

5 Conclusiones

Se ha desarrollado y validado un ensayo sensible y específico para medir los niveles de VLM y anti-VLM en pacientes sometidos a tratamiento para la EII. El formato de ensayo requería un enfoque único debido a la complejidad de una proteína heterodimérica unida a la membrana muy glicosilada como diana del fármaco. Los ensayos tanto de fármaco como anti-fármaco demuestran una alta exactitud y precisión con una alta tolerancia a agentes de interferencia conocidos. El desarrollo de ensayos VLM y anti-VLM es útil para la monitorización clínica y la optimización de fármacos en pacientes individuales.

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la validación de un ensayo homogéneo de cambio de movilidad (HMSA) para la medición de ustekinumab (UTK) y anticuerpos contra ustekinumab (ATU) en el suero de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

20 Antecedentes y objetivos

Ustekinumab es un anticuerpo monoclonal terapéutico que tiene una utilidad potencial en el tratamiento de pacientes con EII que no han respondido a las terapias convencionales o a los antagonistas de TNF α . Ustekinumab es específico para IL-12 e IL-23 a través de su subunidad p40 común y bloquea la inflamación a través de estas vías. La disponibilidad de pruebas de diagnóstico para medir con precisión los niveles séricos de UST y anti-UST (ATU) es necesaria para el uso eficaz de este nuevo agente terapéutico en pacientes con EII. Aquí describimos la validación analítica de un HMSA basado en "competencia" desarrollado para medir los niveles de UTK, así como el HMSA convencional para medir los niveles de ATU en el suero del paciente.

30 Métodos

Se expresó IL-12p40 recombinante soluble (por ejemplo, SEQ ID NO: 7) y se purificó a partir de células de mamífero. Se utilizó IL12p40 recombinante en un formato HMSA basado en "competición" para medir los niveles séricos de UTK en pacientes en terapia con UTK. El suero del paciente se combinó con rIL12p40 para permitir que UTK terapéutico se uniera a rIL12p40. Posteriormente, el UTK marcado de forma fluorescente compitió con UTK no marcado en sueros de pacientes para unirse a su diana, rIL12p40, seguido de separación en cromatografía HPLC de exclusión por tamaños (véase la figura 16). Para el ensayo anti-UTK, se crearon curvas patrón incubando suero humano normal que contenía cantidades conocidas de anticuerpos anti-UTK de conejo con UTK marcado con fluorescencia; los UTK unidos y libres se separaron luego por SEC-HPLC.

Resultados

Los ensayos UTK y ATU muestran una alta precisión y exactitud intraensayo. La precisión intraensayo es inferior al 10 % y la precisión intraensayo es inferior al 15 % de error. La variabilidad entre ejecuciones, instrumentos y analista son menores del 15 % de CV y menores del 20 % de error. (Tabla 5). La sensibilidad para UTK es de 0,224 µg/ml con un intervalo dinámico de 0,625-10 µg/ml (tabla 6). El límite de detección para el ensayo ATU es <1,56 U/ml. No se pudo determinar un valor preciso ya que es demasiado bajo para interponer desde la curva patrón. El intervalo dinámico para ATU es 3,13-150 U/ml en suero no diluido (tabla 6). El suero humano normal enriquecido con UTK o ATU mostró una buena linealidad y recuperación a través de diluciones en serie dentro del intervalo dinámico del ensayo (figura

17). ATU muestra alta tolerancia a los fármacos. Los niveles de 20 µg/ml de UTK no interfieren significativamente con la detección de ATU (tabla 7). Los agentes de interferencia comunes en el suero del paciente se probaron y no interfirieron en los niveles observados en pacientes con EII. Solo el suero altamente hemolizado puede interferir potencialmente pero no a los niveles que se observan normalmente en los sueros de pacientes (figura 18).

Tabla 5. Datos de validación para la precisión y exactitud de los ensayos.

Exactitud y precisión del UTK-HMSA		Precisión interensayo												
		Precisión intraensayo						Precisión interensayo						
		(n=5)		Entre ciclos (n=5)		Entre analistas (n=5)		Entre instrumentos (n=5)		(n=5)		Entre instrumentos (n=5)		
Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
Esperado (µg/ml)	10	5	2,5	10	5	2,5	10	5	10	5	2,5	10	5	2,5
Medido (Media, µg/ml)	8,89	4,52	2,40	10,59	5,03	2,59	10,09	4,93	10,29	5,26	2,66	10,29	5,26	2,89
DT	0,62	0,08	0,05	0,97	0,29	0,13	0,52	0,27	0,49	0,29	0,18	0,49	0,29	0,09
% de CV	6,96	1,76	2,16	9,18	5,67	5,06	5,18	5,39	4,79	5,44	6,95	4,79	5,44	3,15
Exactitud (% de error)	11,14	9,55	4,03	5,88	0,69	3,71	0,94	1,42	2,87	5,28	6,23	2,87	5,28	15,43
Exactitud y precisión de ATU-HMSA		Precisión interensayo												
Exactitud y precisión de ATU-HMSA		Precisión intraensayo						Precisión interensayo						
		(n=5)		Entre ciclos (n=5)		Entre analistas (n=5)		Entre instrumentos (n=5)		(n=5)		Entre instrumentos (n=5)		
		Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta
Esperado (U/ml)	50	20	10	50	20	10	50	20	50	20	10	50	20	10
Medido (Media, U/ml)	49,61	21,08	9,47	50,63	21,51	9,20	51,24	21,48	49,61	20,39	9,19	49,61	20,39	8,78
DT	0,33	0,83	0,78	1,16	0,73	0,60	1,80	0,73	1,85	0,69	0,61	1,85	0,69	0,20
% de CV	0,67	3,95	8,27	2,30	3,39	6,52	3,51	3,39	3,74	3,37	6,60	3,74	3,37	2,30
Exactitud (% de error)	0,79	5,42	5,30	1,25	7,54	7,96	2,47	7,41	0,79	1,97	8,11	0,79	1,97	12,23

Tabla 6. Límites de cuantificación para cada ensayo.

Límites de cuantificación				
Ensayo	Límite de blanco	Límite de detección	Límite inferior de cuantificación	Límite superior de cuantificación
UTK-HMSA	n=30	n=30	n=36	n=36
	0,077 µg/ml	0,224 µg/ml	0,625 µg/ml	10 µg/ml
ATU-HMSA	n=30	n=30	n=30	n=30
	Demasiado bajo para interpolar	< 1,56U/ml	3.13U/ml	150U/ml

Tabla 7. Interferencia farmacológica en el ensayo anti-UTK.

UTK [µg/ml]	ATU total [U/ml]
20	58,8
0	51,7
20	16,7
0	22,1
20	5,6
0	9,2

5 Conclusiones

El HMSA para UTK y ATU mostró una alta exactitud y precisión en un amplio intervalo dinámico. La plataforma HMSA permitió la detección de UTK y ATU incluso en presencia de agentes interferentes que se sabe que limitan la utilidad de los métodos ELISA/ECLIA. El desarrollo de una nueva plataforma HMSA basada en la "competencia" permite la medición de los niveles terapéuticos de los medicamentos cuando no es factible un HMSA convencional.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra experimentos realizados para mejorar el intervalo dinámico del ensayo homogéneo de cambio de movilidad (HMSA) para la medición de vedolizumab (VDZ).

En un esfuerzo por mejorar el intervalo dinámico del ensayo, se modificó el ensayo aumentando la cantidad de VDZ-Alexa488 utilizada en el ensayo en 1,6 veces. El aumento de la cantidad de VDZ marcado y el aumento proporcional de la cantidad de antígeno $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, heterodímero $\alpha 4\Delta 620/\beta 7\Delta 527$; véase la figura 13) aumentó el intervalo dinámico del ensayo. Además, el cambio de la cantidad de $\alpha 4\beta 7$ en relación con VDZ marcado afectó el límite inferior de cuantificación. El exceso de antígeno en relación con VDZ marcado hizo que el ensayo fuera relativamente insensible al fármaco en los sueros de pacientes y elevó el límite inferior de cuantificación. Por el contrario, muy poco antígeno en relación con VDZ marcado tuvo el efecto de disminuir el límite superior de cuantificación. El aumento de la cantidad de VDZ marcado de 75 ng/pocillo a 120 ng/pocillo (1,6 veces) y la titulación del antígeno de manera que la presencia de antígeno se une al 75-80 % de VDZ marcado proporcionó el mejor compromiso entre los de gama baja la sensibilidad necesaria así como un intervalo dinámico mejorado que permitiría la medición del fármaco en sueros de pacientes sin requerir diluciones en la mayoría de los casos.

Además, los datos se representan de manera tal que el área del pico VDZ-Alexa488 (sin dividir entre el área del pico de control Bloqueado-Alexa 488) se representa contra el registro de la concentración de VDZ.

1. Límites de ensayo

Límite de blanco

El límite de blanco (LOB) se determinó a partir de 30 réplicas del blanco de la curva patrón. El blanco de la curva patrón (control negativo) en todos los ensayos consistió en un 4 % de suero humano normal + 40 ng de VDZ-Alexa488 + 165 ng de $\alpha 4\beta 7$ por cada 100 µl de inyección. Se calculó el promedio (promedio) + 1,645DT del área del pico de VDZ-Alexa488 y luego se utilizó para el cálculo del LOD.

Tabla 8. Límite de ensayo de blanco (LOB).

N	30
Media (área máxima de VDZ-Alexa488)	1,91
DT (VDZ-Alexa488 área de pico)	0,09
El promedio (media) + 1,645DT	2,06

(continuación)

N	30
LOB interpolado	0,156/ml*
* El promedio (media) + 1,645DT estaba justo por debajo del punto más bajo de la curva y, por lo tanto, el punto más bajo de la curva se tomó para el LOB.	

Límite de detección

- 5 El límite de detección (LOD) se determinó usando el LOB medido y las réplicas de suero que contenía VDZ en una concentración baja que se aproxima al LOB. Se eligió el patrón 10 porque es el punto más bajo de la curva y el más cercano al LOB. El LOD se calculó usando la ecuación: $LOD = LOB + 1,645(DT_{\text{muestra de baja concentración}})$ (Armbruster et al., 2008). El valor se interpola a partir de la curva patrón promediada de los experimentos utilizados en el cálculo para obtener la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

10

Tabla 9. Ensayo de límite de detección.

N	30
Media (área máxima de VDZ-Alexa488)	1,91
DT (VDZ-Alexa488 área de pico)	0,061
1,645*SD	0,100
Interpolado (1,645*DT)	Demasiado bajo para interpolar
LOD = El promedio (media) + 3*DT	0,457 $\mu\text{g/ml}$

Límite de cuantificación

- 15 El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se determinó mediante el análisis de concentraciones interpoladas de 30 réplicas de una muestra positiva de VDZ de baja concentración. En este caso, se eligió el patrón 8 (concentración sérica efectiva de 0,625 $\mu\text{g/ml}$). El límite superior de cuantificación (ULOQ) se determinó mediante el análisis de 30 réplicas de una muestra positiva de VDZ de alta concentración (concentración sérica efectiva igual a 14 $\mu\text{g/ml}$). El LLOQ se definió como la concentración que resulta en un $CV \leq 20\%$ con $\text{Error} \leq 25\%$ y, por lo tanto, mide la exactitud y la precisión del ensayo a una concentración baja de analito. El ULOQ también fue calificado por $CV \leq 20\%$ con $\text{Error} \leq 25\%$.

20

Tabla 10. LLOQ y ULOQ.

	LLOQ	ULOQ
N	30	30
Esperado ($\mu\text{g/ml}$)	1	25
Media ($\mu\text{g/ml}$)	1,05	20,95
DT ($\mu\text{g/ml}$)	0,12	1,44
CV (%)	11,39	6,86
Error (%)	5,13	-16,19

- 25 Estos criterios dieron como resultado los siguientes valores para los Límites de ensayo:

Tabla 11. Límites de cuantificación de los ensayos.

LOD	0,457 $\mu\text{g/ml}$
LLOQ	1 $\mu\text{g/ml}$
ULOQ	25 $\mu\text{g/ml}$

2. Interferencia

30

Interferencia de Anticuerpo a Vedolizumab (ATV)

En este experimento, se agregaron 2,5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de VDZ a suero humano normal o a varias concentraciones de suero ATV positivo de conejo. Estas muestras se analizaron usando el ensayo y se calculó el % de recuperación.

35

Tabla 12. Interferencia de ATV.

Pico de VDZ (µg/ml)	Control de VDZ medido (µg/ml) (Sin ATV)	% de recuperación					
		0 U/ml	3,13 U/ml	6,25 U/ml	12,5 U/ml	25 U/ml	50 U/ml
2,5	2,23	100	90	82	62	0	0
5	4,47	100	93	88	77	60	22
10	9,15	100	91	85	77	71	55
20	17,53	100	87	81	73	69	59

La tolerancia del ensayo a ATV es de hasta 6,25 U/ml en este experimento. Se espera interferencia de ATV ya que el ATV neutralizador competirá con $\alpha 4\beta 7$ para unirse al VDZ del paciente. Solo se espera que se detecte VDZ vinculado a ATV no neutralizante.

Integrina $\alpha 4\beta 7$ Interferencia de sustrato

Para probar la interferencia de $\alpha 4\beta 7$, las titulaciones se realizaron en el intervalo de 1 a 1000 ng/ml. Las concentraciones de VDZ se representaron en la intersección del eje X que corresponde a la concentración cero de cada agente interferente (figura 19).

Tabla 13. Interferencia de $\alpha 4\beta 7$ (100 ng/ml).

Control Positivo de VDZ	Control de alta (12 µg/ml)	Control de media (4 µg/ml)	Control de baja (1 µg/ml)
Media (µg/ml)	12,57	3,77	1,22
DT (µg/ml)	0,23	0,01	0,04
CV (%)	1,8	0,3	3,5
Recuperación (%)	109,6	108,1	106,7

No hubo una interferencia significativa de los niveles de $\alpha 4\beta 7$ muy por encima de los niveles que uno esperaría ver en los sueros de pacientes tratados con VDZ.

3. Estabilidad del antígeno

La estabilidad del antígeno $\alpha 4\beta 7$ se evaluó mediante almacenamiento a 4 grados (4 °C) durante 1 semana. Después de 1 semana, el $\alpha 4\beta 7$ se retiró del almacenamiento a 4 °C y se analizó contra una parte alícuota fresca almacenada a -70 °C. Los datos de las muestras de almacenamiento a 4 °C se compararon con los obtenidos antes del almacenamiento y se calculó el porcentaje de error. Las alícuotas se consideraron estables a 4 °C si el error estaba dentro del 25 %.

Tabla 14. Estabilidad acelerada.

Punto de tiempo		Semana 0			Semana 1		
Cont. Pos. de VDZ		Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
4 °C	Media (µg/ml)	10,00	3,15	0,88	11,06	4,42	1,12
	DT (µg/ml)	0,21	0,45	0,06	0,81	0,21	0,06
	CV (%)	2,11	14,24	6,65	7,32	4,81	5,21
	Error (%)	-16,64	-21,35	-12,34	-7,81	10,50	12,05

Estabilidad acelerada de $\alpha 4\beta 7$. El antígeno almacenado a -70 °C se utilizó en el ensayo para probar los controles positivos de VDZ. Los controles se encontraron dentro de las especificaciones (Error ≤ 25 % y CV ≤ 25 %). El antígeno almacenado a 4 °C se utilizó en el ensayo para probar los controles positivos de VDZ. Estos controles también se encontraron dentro de las especificaciones. Además, no hubo una pérdida obvia de la potencia del antígeno como resultado de su almacenamiento a 4 °C en comparación con -70 °C.

4. Experimentos adicionales de intervalo dinámico

Se generaron tres curvas patrón usando una cantidad 1X de VDZ marcado (por ejemplo, 75 ng/pocillo de VDZ-Alexa488), así como cantidades de 2X y 4X. La figura 20 muestra que el aumento proporcional de las concentraciones de VDZ-Alexa488 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ utilizadas en el ensayo aumenta el intervalo dinámico del ensayo. También aumenta la tolerancia a los anticuerpos antifármacos. Un LLOQ máximo de 1 µg/ml fue el criterio para este ensayo. En particular, el aumento de la cantidad de VDZ marcado y $\alpha 4\beta 7$ en 1,6 veces permitió un LLOQ máximo de 1 µg/ml mientras que proporciona un intervalo superior mejorado de 25 µg/ml (véase la tabla 11).

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, un experto en la materia apreciará que pueden ponerse en prácticas ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5 LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL

SEQ ID NO:1

Fragmento de integrina alfa 4 humana

MAWEARREPGPRRAAVRETVMLLLCLGVPTGRPYNVDTESALLYQGPHTLFGYSVVLHSHGANRWLLVG
 APTANWLANASVINPGAIYRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWLGVTLRQPGENG
 IVTCGHRWKNIFYIKNENKLPTGGCYGVPPDLRTELSKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQAGISSFYTKDL
 IVMGAPGSSYWTGSLFVYNIITNKYKAFLDKQNQVKFGSYLGYSVGAGHFRSQHTTEVVGGAPQHEQIGK
 AYIFSIDEKELNIIHEMKGKGLGSYFGASVCAVDLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVVFYINSGSGAV
 MNAMETNLVGS DKYAARFGESIVNLGDI DNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIIYNGRADGISSTFSQRIEG
 LQISKLSMFGQSIGQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRPVVIVDASLSHPESVNRTRKFDCEVNG
 WPSVICDLTLCFSYKKEVPGYIVLFYNMSLDVNRKAESPFRFYFSSNGTSDVITGSIQVSSREANCRTH
 QAFMRKDVRDILTPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFPPLQPILOQKKEKDIMKKTINFAR

10

SEQ ID NO:2

Fragmento de integrina beta 7 humana

MVALPMVLVLLLVL SRGESELD AKI PSTGDATEWRNPHLSMLGSCQPAPSCQKCILSHPSCAWCKQLNFT
 ASGEAEARRCARREELLARGCPLEEELEPRGQOQEVLDQDPLSQGARGEGATQLAPQVRVTLRPGEPQQL
 QVRFLRAEGYPVDLYYLMDSL SYMKDDL ERVRQLGHALLVRLQEVTHSVRIGFGSFVDKTVLPFVSTVPS
 KLRHPCPTRLERCQSPFSFHHVLSLTGDAQAFEREVGRQSVSGNLDSPEGGFDAI LQAALCQEQIGWRNV
 SRLLVFTSDDTFHTAGDGKLG I FMPSDGHCHLDSNGLYSRSTEFDYPSVGQVAQALSAANIQPIFAVTS
 AALPVYQELSKLIPKSAVGELSEDSSNVVQLIMDAYNSLSSTVTLEHSSLPPGVHISYESQCEGPEKREG
 KAEDRGQCNHVRINQTVTFWVSLQATHCLPEPHLLRLRALGFSEELIVELHTLDCNCSDTQPQAPHCS
 D GQGHLCQCGVCSAPGRLGRLCECSVAELSSPDLESGC

15

SEQ ID NO:3

Fragmento de integrina alfa 4 humana con péptido ácido

MAWEARREPGPRRAAVRETVMLLLCLGVPTGRPYNVDTESALLYQGPHTLFGYSVVLHSHGANRWLLVG
 APTANWLANASVINPGAIYRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWLGVTLRQPGENG
 IVTCGHRWKNIFYIKNENKLPTGGCYGVPPDLRTELSKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQAGISSFYTKDL
 IVMGAPGSSYWTGSLFVYNIITNKYKAFLDKQNQVKFGSYLGYSVGAGHFRSQHTTEVVGGAPQHEQIGK
 AYIFSIDEKELNIIHEMKGKGLGSYFGASVCAVDLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVVFYINSGSGAV
 MNAMETNLVGS DKYAARFGESIVNLGDI DNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIIYNGRADGISSTFSQRIEG
 LQISKLSMFGQSIGQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRPVVIVDASLSHPESVNRTRKFDCEVNG
 WPSVICDLTLCFSYKKEVPGYIVLFYNMSLDVNRKAESPFRFYFSSNGTSDVITGSIQVSSREANCRTH
 QAFMRKDVRDILTPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFPPLQPILOQKKEKDIMKKTINFARTGGLAQCEKE
 LQALEKENAQLEWELQALEKELAQ

20

SEQ ID NO:4

Fragmento de integrina beta 7 humana con la secuencia BASE-pl del péptido Velcro que contiene una Cys en las posiciones "d" del péptido de repetición de héptada con sitio de escisión de TEV y marcador His6

25

MVALPMVLVLLLVL SRGESELD AKI PSTGDATEWRNPHLSMLGSCQPAPSCQKCILSHPSCAWCKQLNFT
 ASGEAEARRCARREELLARGCPLEEELEPRGQOQEVLDQDPLSQGARGEGATQLAPQVRVTLRPGEPQQL
 QVRFLRAEGYPVDLYYLMDSL SYMKDDL ERVRQLGHALLVRLQEVTHSVRIGFGSFVDKTVLPFVSTVPS
 KLRHPCPTRLERCQSPFSFHHVLSLTGDAQAFEREVGRQSVSGNLDSPEGGFDAI LQAALCQEQIGWRNV
 SRLLVFTSDDTFHTAGDGKLG I FMPSDGHCHLDSNGLYSRSTEFDYPSVGQVAQALSAANIQPIFAVTS
 AALPVYQELSKLIPKSAVGELSEDSSNVVQLIMDAYNSLSSTVTLEHSSLPPGVHISYESQCEGPEKREG
 KAEDRGQCNHVRINQTVTFWVSLQATHCLPEPHLLRLRALGFSEELIVELHTLDCNCSDTQPQAPHCS
 D GQGHLCQCGVCSAPGRLGRLCECSVAELSSPDLESGCGGLENGYFQGGKNAQCKKKLQALKKKNAQLKWK
 LQALKKKLAQGGHHHHH

SEQ ID NO:5

ES 2 735 085 T3

IL-12p40 humana de tipo silvestre

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG
SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRF
TCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEV
MVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFVCVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC

5 SEQ ID NO:6
Variante de IL-12p40 humana (C199A, C274A)

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG
SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRF
TCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSAPAAEESLPIEV
MVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFVAVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC

10 SEQ ID NO:7
Variante de IL-12p40 humana (C199A, C274A) con marcador de hexahistidina

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG
SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRF
TCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSAPAAEESLPIEV
MVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFVAVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCHHHHHH

15 SEQ ID NO:8
Péptido ACID con resto de cisteína (3)
AQCEKELQALEKENAQLWELQALEKELAQ

20 SEQ ID NO:9
Péptido BASE con resto de cisteína (16), Sitio de escisión de TEV (3-9) y marcador de hexahistidina (46-51)
GLENQYFQGGKNAQCKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQGGHHHHHH

25 SEQ ID NO:10
Sitio de escisión de TEV
EXXYXQ/S
X es cualquier resto de aminoácido

30 SEQ ID NO:11
Variante de IL-12p40 humana (C199S, C274S)

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG
SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRF
TCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSASPAAEESLPIEV
MVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFVSVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC

35 SEQ ID NO:12
Variante de IL-12p40 humana (C199A, C274S)

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG
SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRF
TCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSAPAAEESLPIEV
MVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFVSVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC

40 SEQ ID NO:13
Variante de IL-12p40 humana (C199S, C274A)

ES 2 735 085 T3

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG
SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF
TCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSASPAAEESLPIEV
MVDVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFAVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia o el nivel de un agente biológico en una muestra, comprendiendo el método:
 - 5 (a) poner en contacto la muestra con un antígeno soluble no marcado que se une al agente biológico para formar un complejo no marcado entre el antígeno y el agente biológico en la muestra;
 - (b) poner en contacto la muestra de la etapa (a) con una forma marcada del agente biológico para formar un complejo marcado entre el antígeno y el agente biológico marcado;
 - 10 (c) someter los complejos marcados y no marcados a cromatografía de exclusión por tamaños para separar los complejos marcados y no marcados de los agentes biológicos marcados libres y para detectar una cantidad del agente biológico marcado libre; y
 - (d) comparar la cantidad del agente biológico marcado libre detectado en la etapa (c) con una curva patrón de cantidades conocidas del agente biológico, determinando de este modo la presencia o nivel del agente biológico en la muestra.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el antígeno comprende un fragmento soluble, variante o monómero de una proteína unida a membrana, una proteína glucosilada, una proteína multimérica, una proteína insoluble, una proteína que es difícil de expresar o purificar y/o una proteína grande.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno es un fragmento soluble de una molécula de la superficie celular.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la molécula de la superficie celular es una molécula de adhesión celular (CAM).
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en donde la molécula de adhesión celular (CAM) es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en una Ig de la superfamilia de CAM, una integrina, una cadherina y una selectina.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en donde la integrina es una integrina $\alpha 4\beta 7$; y en donde el fragmento soluble comprende un fragmento $\alpha 4$ que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 y/o un fragmento $\beta 7$ que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en donde el agente biológico es vedolizumab.
8. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno es una subunidad p40 de IL-12 o IL-23 o un monómero del mismo.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en donde la subunidad p40 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad respecto de las SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12 o 13.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde el agente biológico es ustekinumab.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la curva patrón se genera incubando el antígeno y el agente biológico marcado con una dilución en serie de cantidades conocidas del agente biológico.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el área bajo la curva (ABC) del agente biológico marcado libre se representa frente al log de cantidades conocidas del agente biológico y el nivel del agente biológico en la muestra se calcula por interpolación.
- 50 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la muestra es suero.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el agente biológico marcado es un agente biológico marcado con fluoróforo.
- 55 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la muestra se obtiene de un sujeto que recibe terapia con el agente biológico.

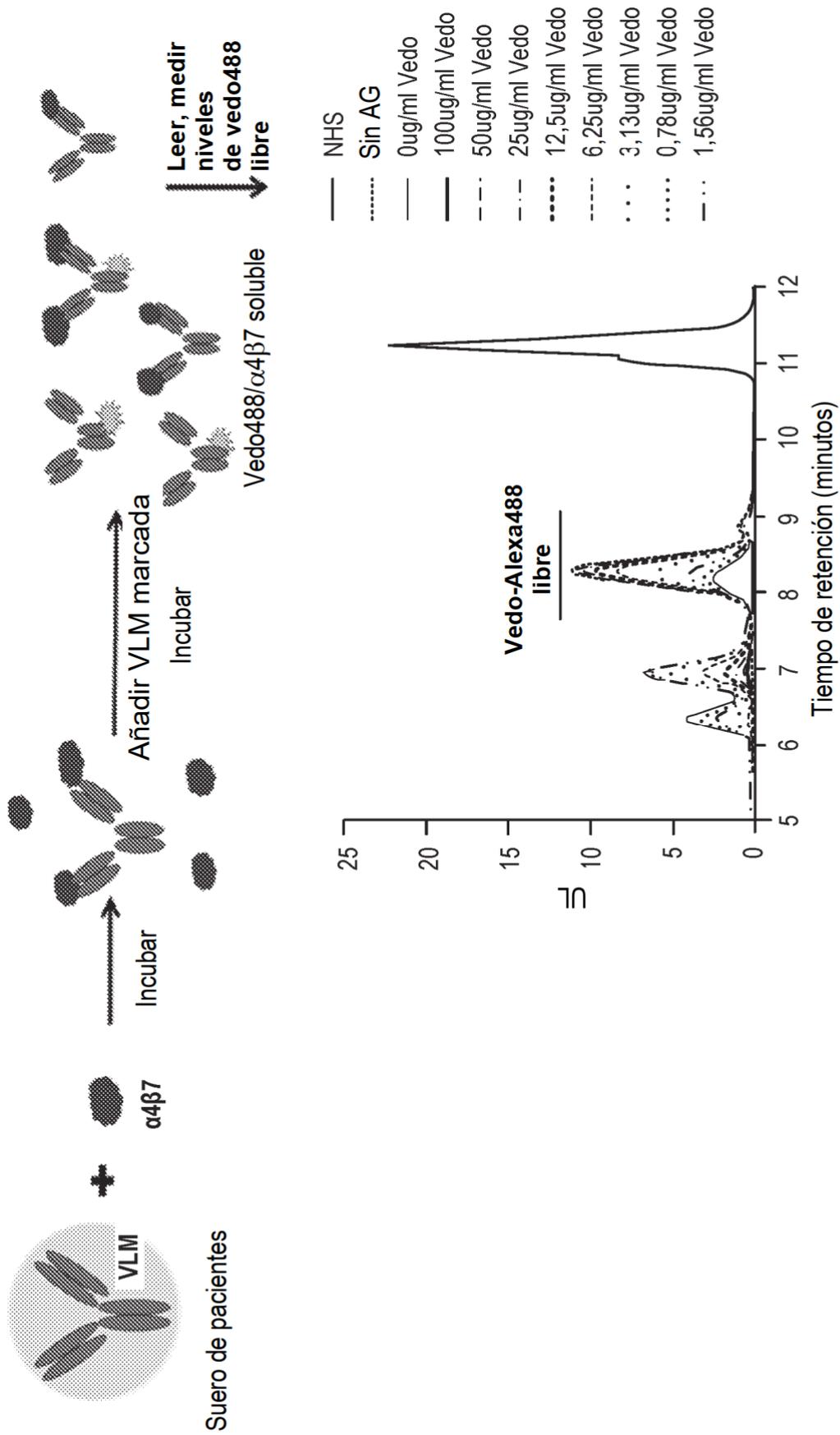


FIG. 1

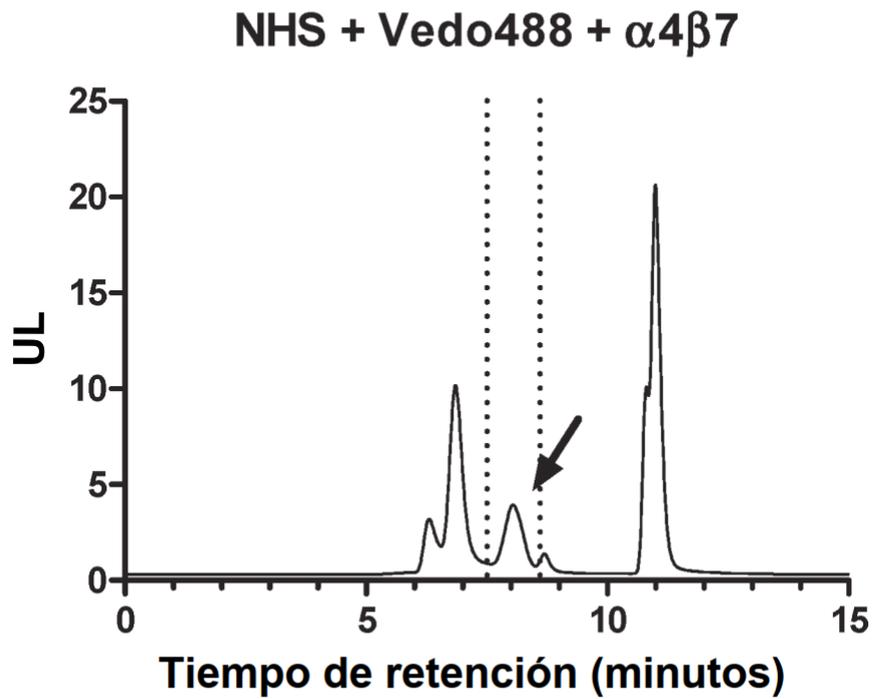
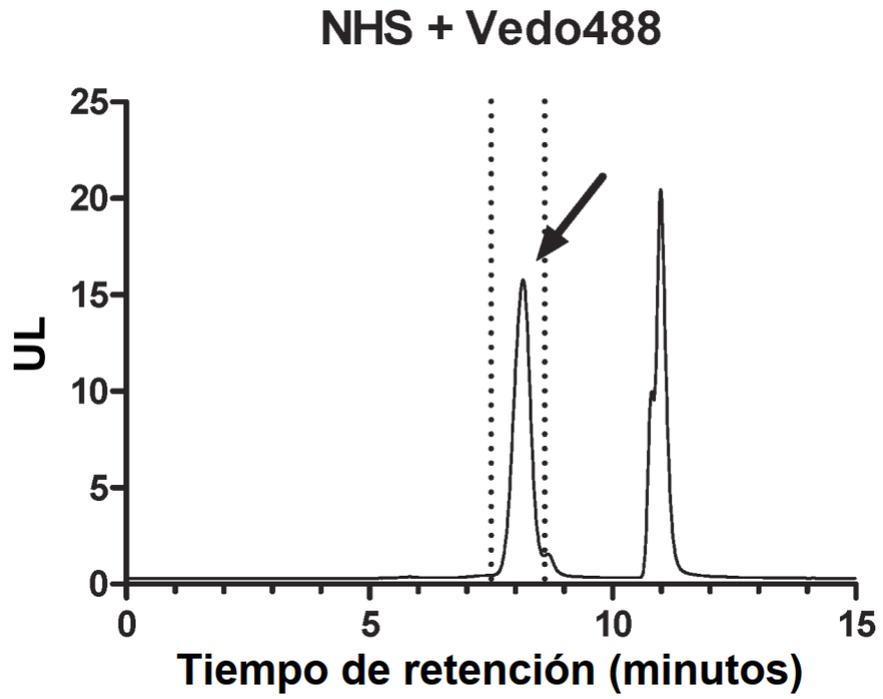


FIG. 2

Ensayo farmacológico de Vedolizumab

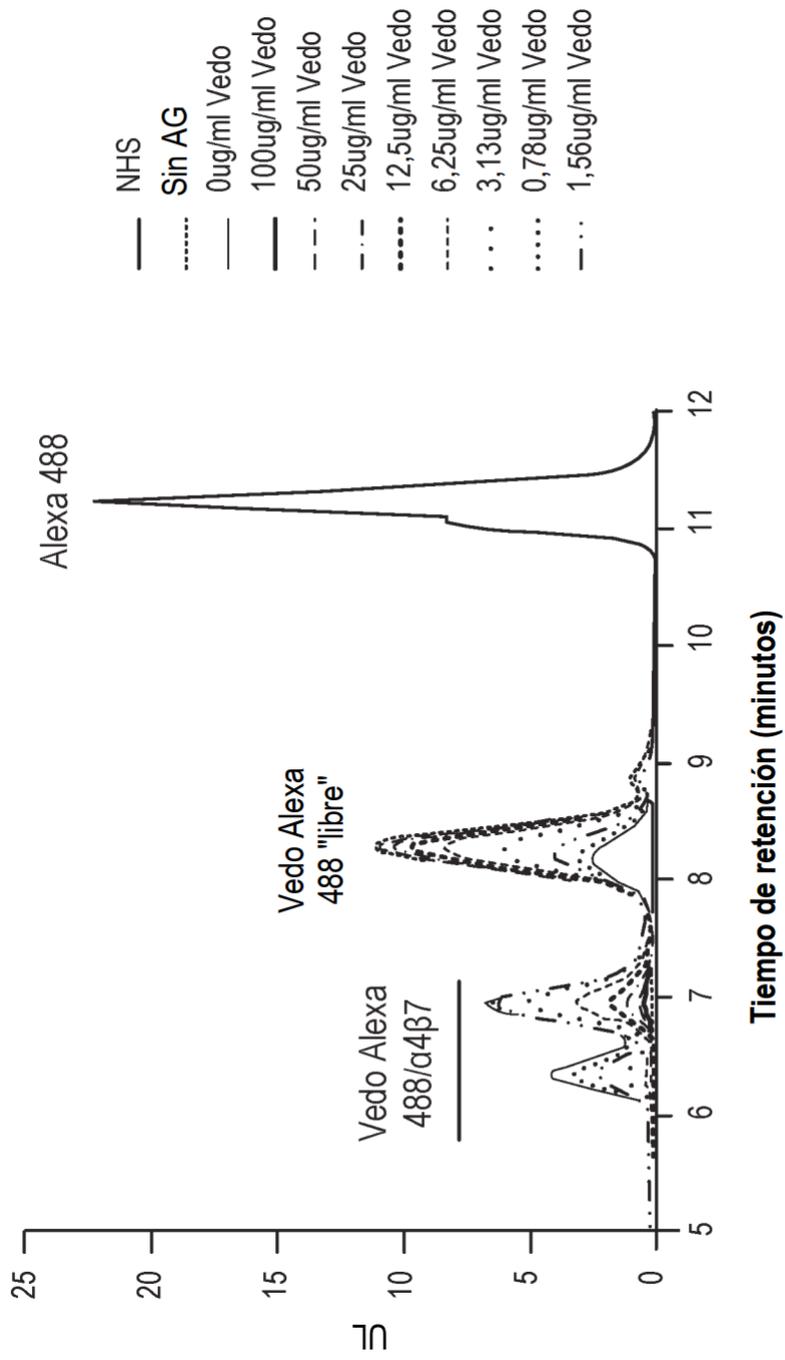


FIG. 3

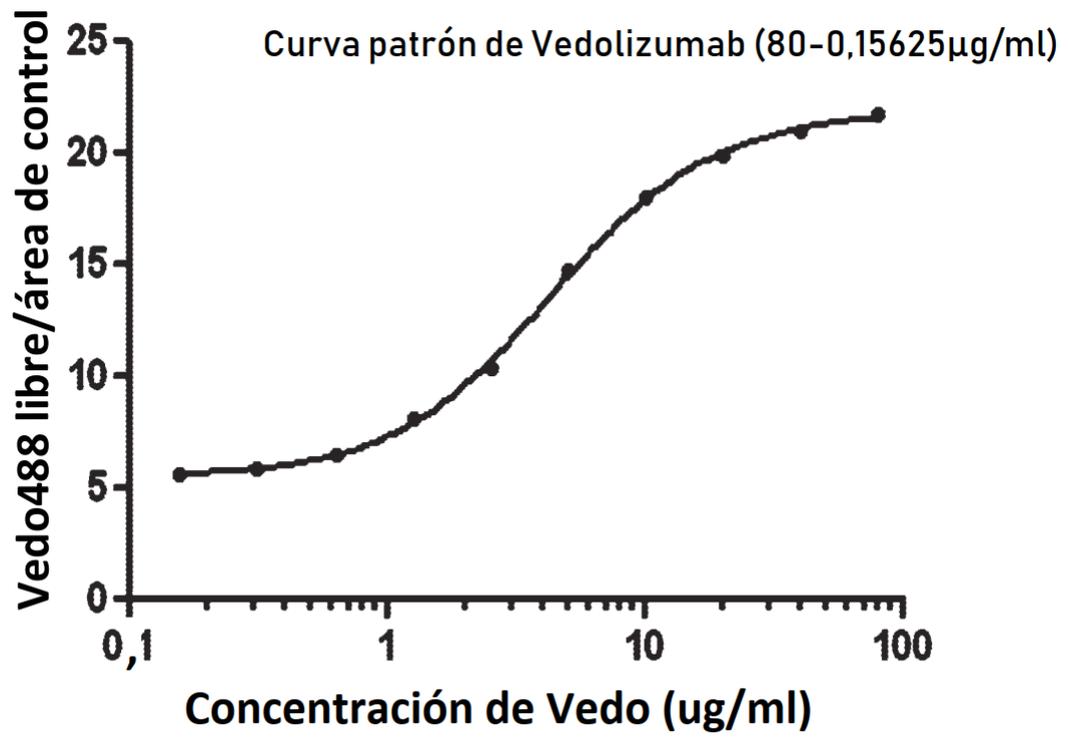


FIG. 4

Curva patrón de Vedolizumab (80-0,15625 μ g/ml)

Parámetros de ensayo (n=30)	Calculada (μg/ml)
Límite de blanco (LOB)	0,054
Límite de detección (LOD)	0,35
Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	0,625
Límite superior de cuantificación (ULOQ)	14

FIG. 5

VLM: Validación: Precisión y exactitud intra-ensayo

		Promedio (n=10)	SD	%CV	% Error
Control de alta	16 µg/ml	15,66	1,05	6,73	-2,08
Control de media	4 µg/ml	4,11	0,17	4,30	2,91
Control de baja	1 µg/ml	1,24	0,033	2,73	24,08

FIG. 6

Ensayo de anti-vedolizumab (ATV)

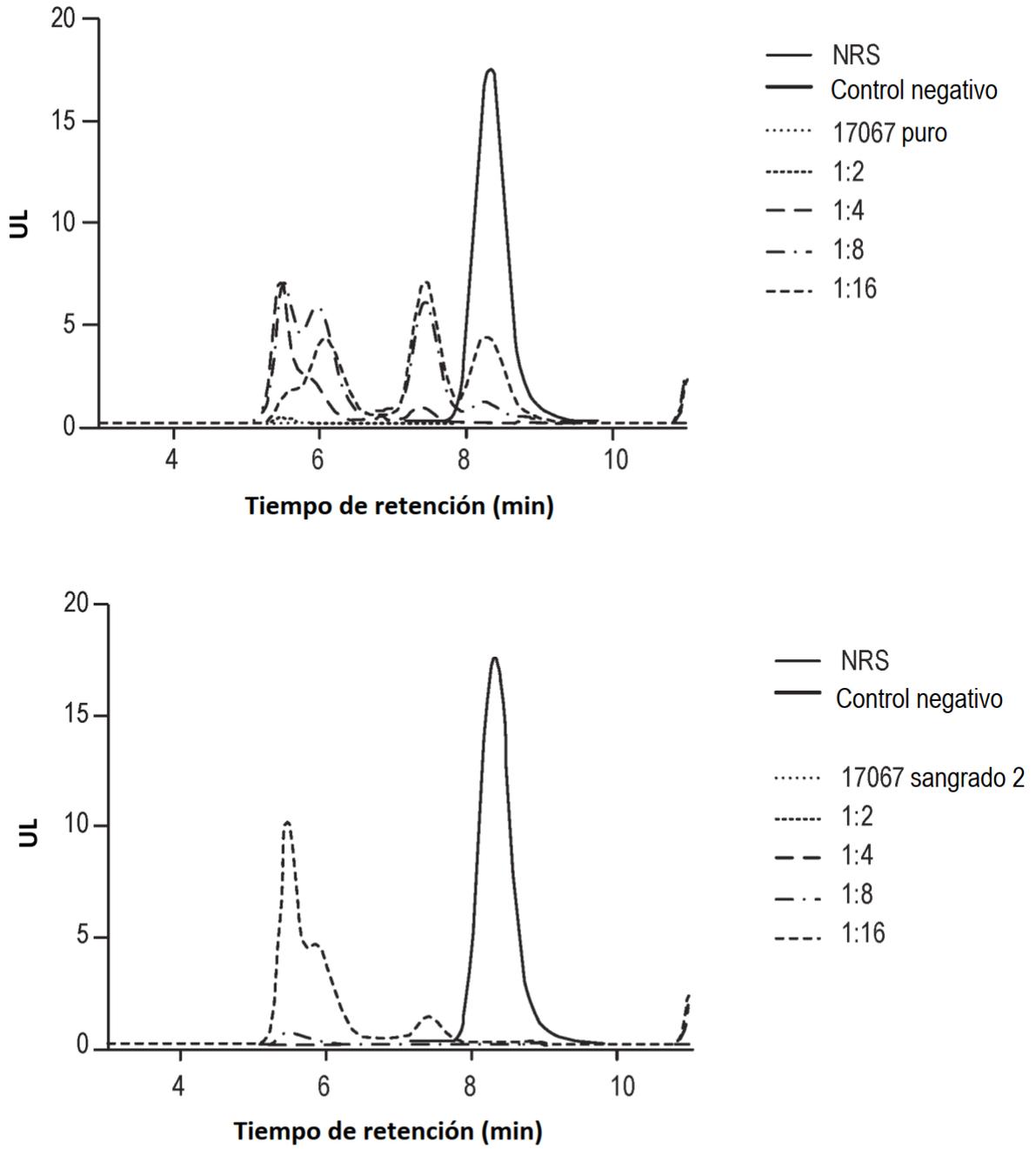
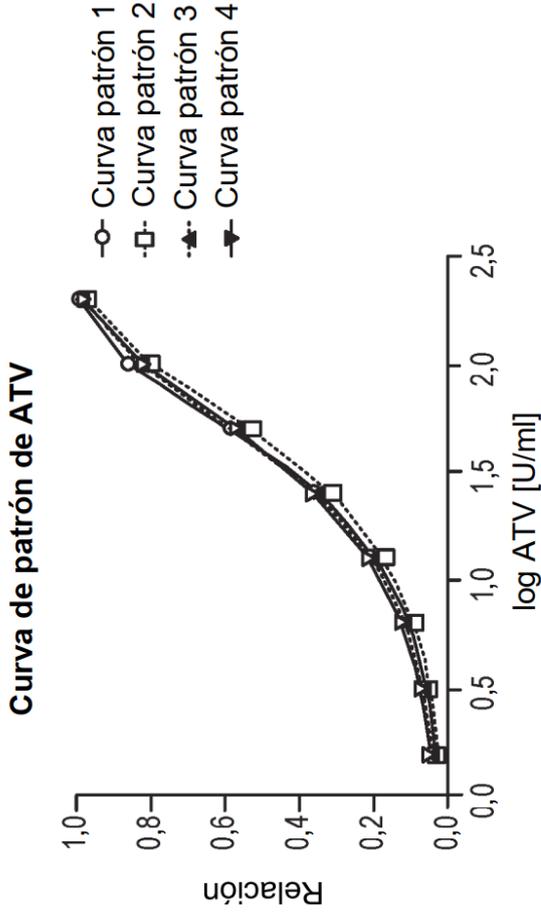


FIG. 7

ATV: Validación: Curva patrón (200 U/ml-1,56 U/ml)



ATV [U/ml]	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8
Experimento	200	100	50	25	13	6	3,13	1,56
1	192	104	49	25	13,1	6,6	3,04	1,05
2	191	103	49	25	12,6	6,3	3,16	1,53
3	193	102	50	25	12,5	6,3	3,16	1,54
4	192	103	49	25	12,4	6,3	3,15	1,55
PROMEDIO	192,2	103,1	49,3	24,8	12,7	6,4	3,1	1,4
DES. TÍP.	0,7	0,8	0,6	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2
%CV	0,4	0,8	1,3	0,8	2,5	2,2	1,8	17,2
% DE RECUP.	96,1	103,1	98,7	99,3	101,4	102,2	100,0	90,7

FIG. 8

ATV: Validación: LOB y LOD, LLOQ y ULOQ

Límites de detección

	Media (n = 25)	SD	1,65SD	Media +1,65SD	(LOB) Valor interpolado
LOB	0,00828	0,00013	0,00022	0,00850	Too low to interpolate
LOD	LOB + 1,65DT (muestra de baja conc.): no pudo determinarse ya que LOB no tenía valor				

LOD = LLOQ = 3,13

Límites de cuantificación

	Promedio (n = 36)	SD	% CV	% Error
LLOQ	3,13 (U/ml)	0,08	2,14	-17,57
ULOQ	150 (U/ml)	2,67	1,69	-5,29

FIG. 9

ATV: Validación: Precisión inter-ensayo

Precisión inter-ensayo n=4

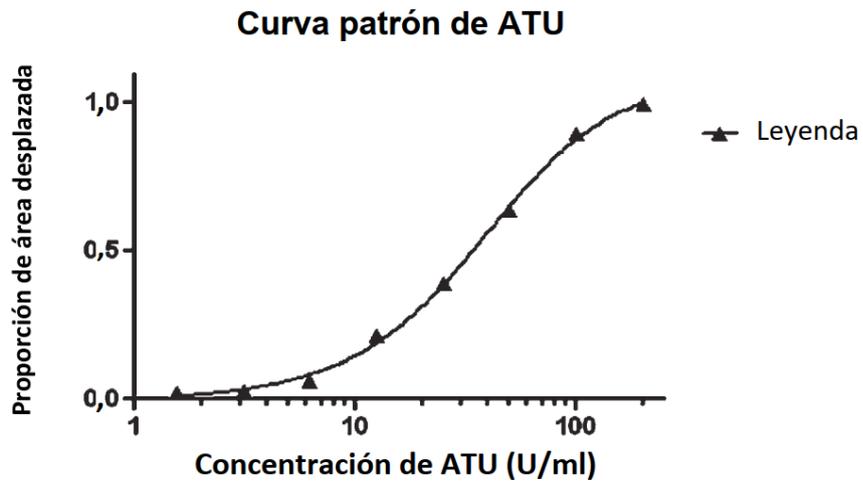
		Promedio (n=4)	SD	%CV	% Error
Control de alta	50 (U/ml)	50,8	3,9	7,7	1,5
Control de media	25 (U/ml)	25,2	1,3	5,3	0,9
Control de baja	12,5 (U/ml)	13,1	0,6	4,7	5,0

FIG. 10

Ensayo farmacológico de Ustekinumab
– Especificaciones de validación

Parámetros de ensayo (n=30)	Calculada ($\mu\text{g/ml}$)
Límite de blanco (LOB)	0,233
Límite de detección (LOD)	0,147
Límite inferior de cuantificación (ULOQ)	0,625
Límite superior de cuantificación (ULOQ)	8

FIG. 11



Controles (n=1)	DT	%CV	%Error
44,71	NA	NA	-10,58
24,06	NA	NA	-3,76
13,87	NA	NA	-10,96

FIG. 12

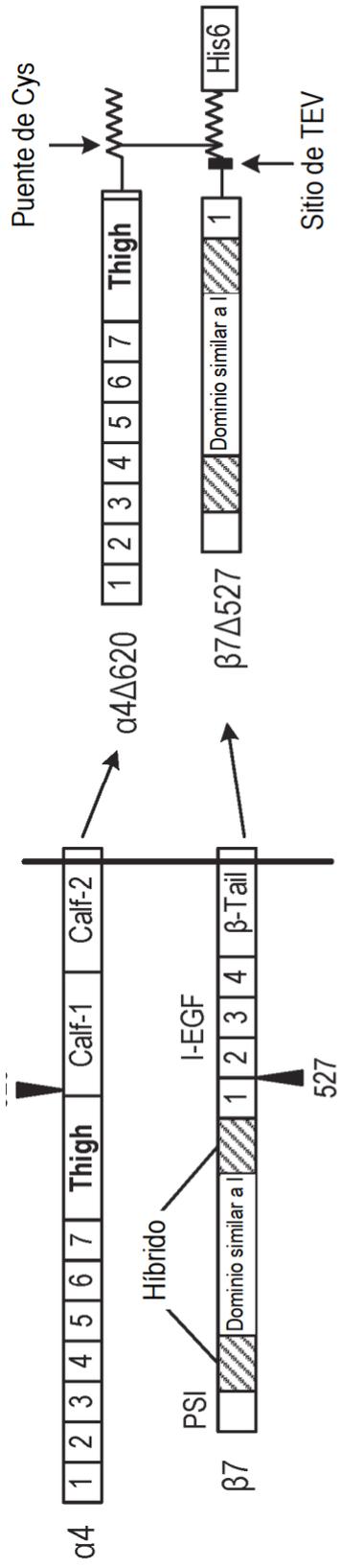


FIG. 13

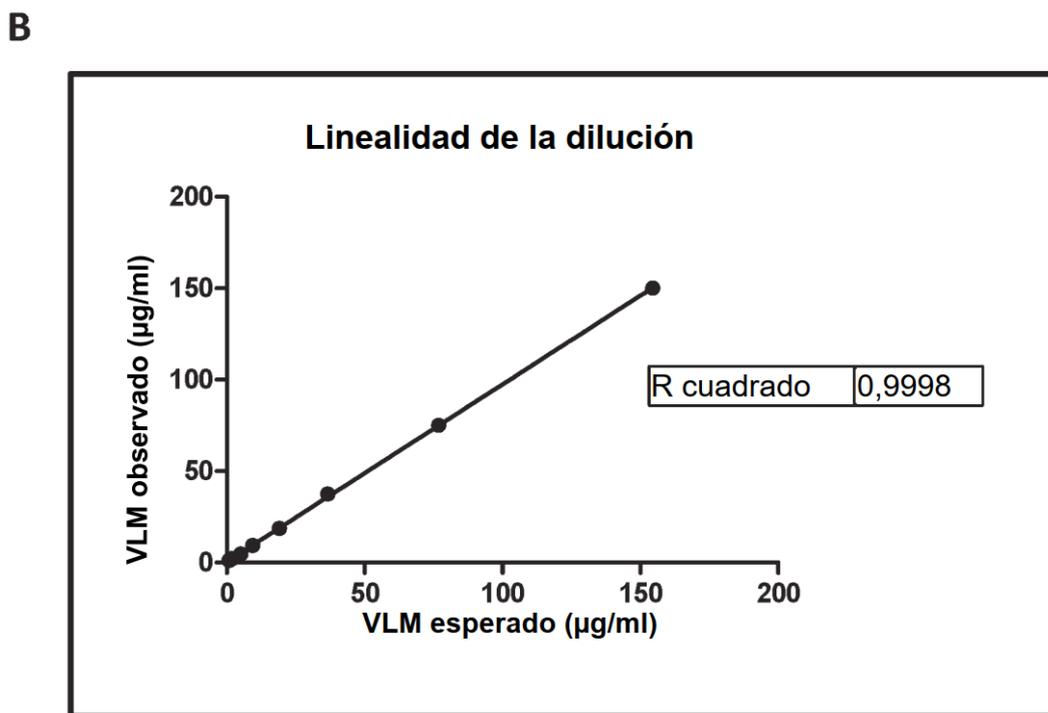
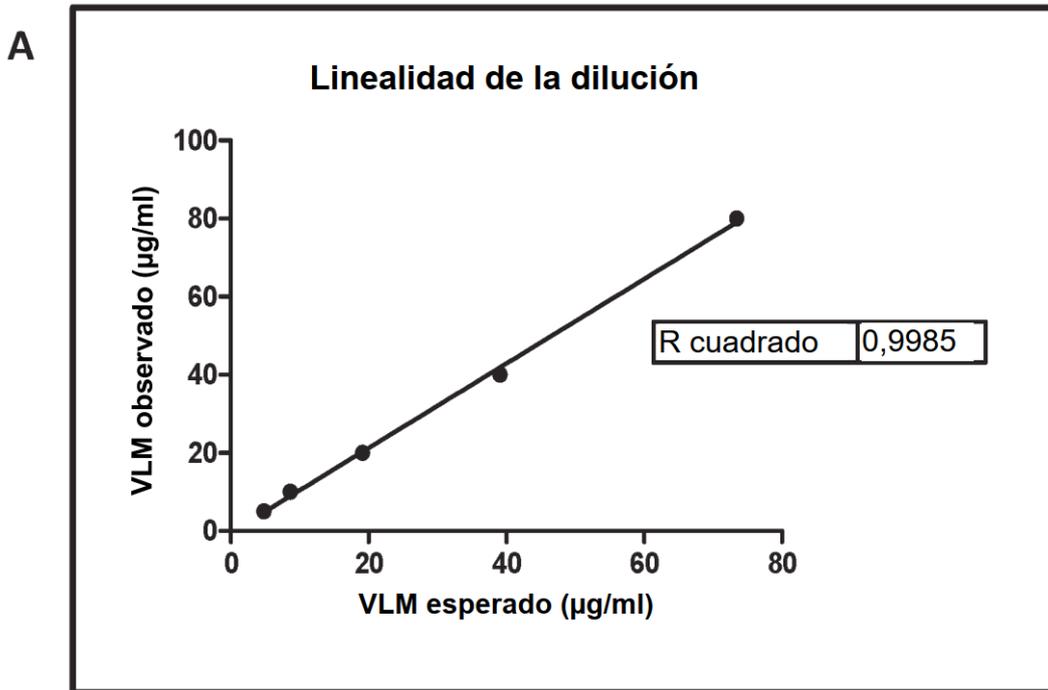
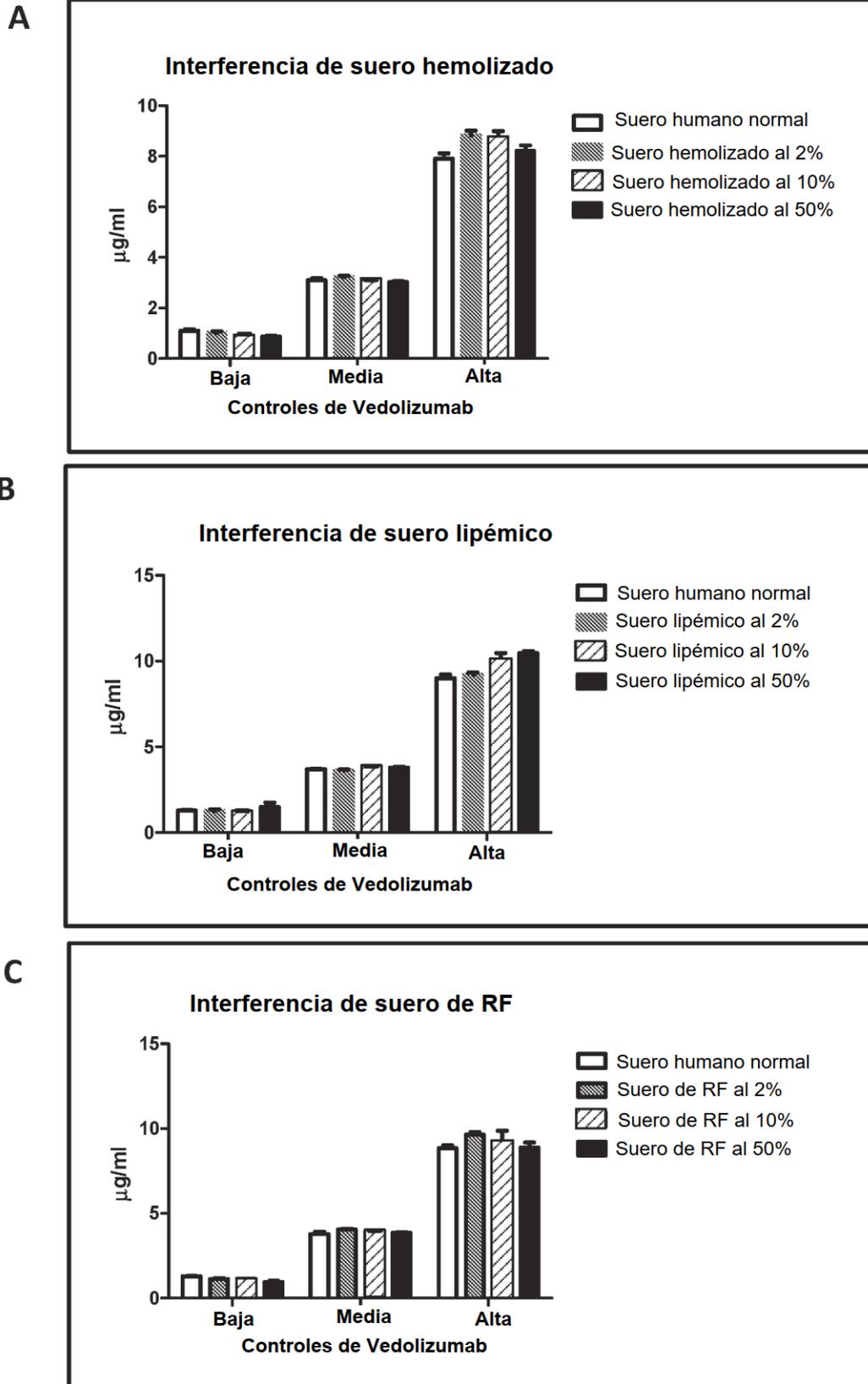


FIG. 14



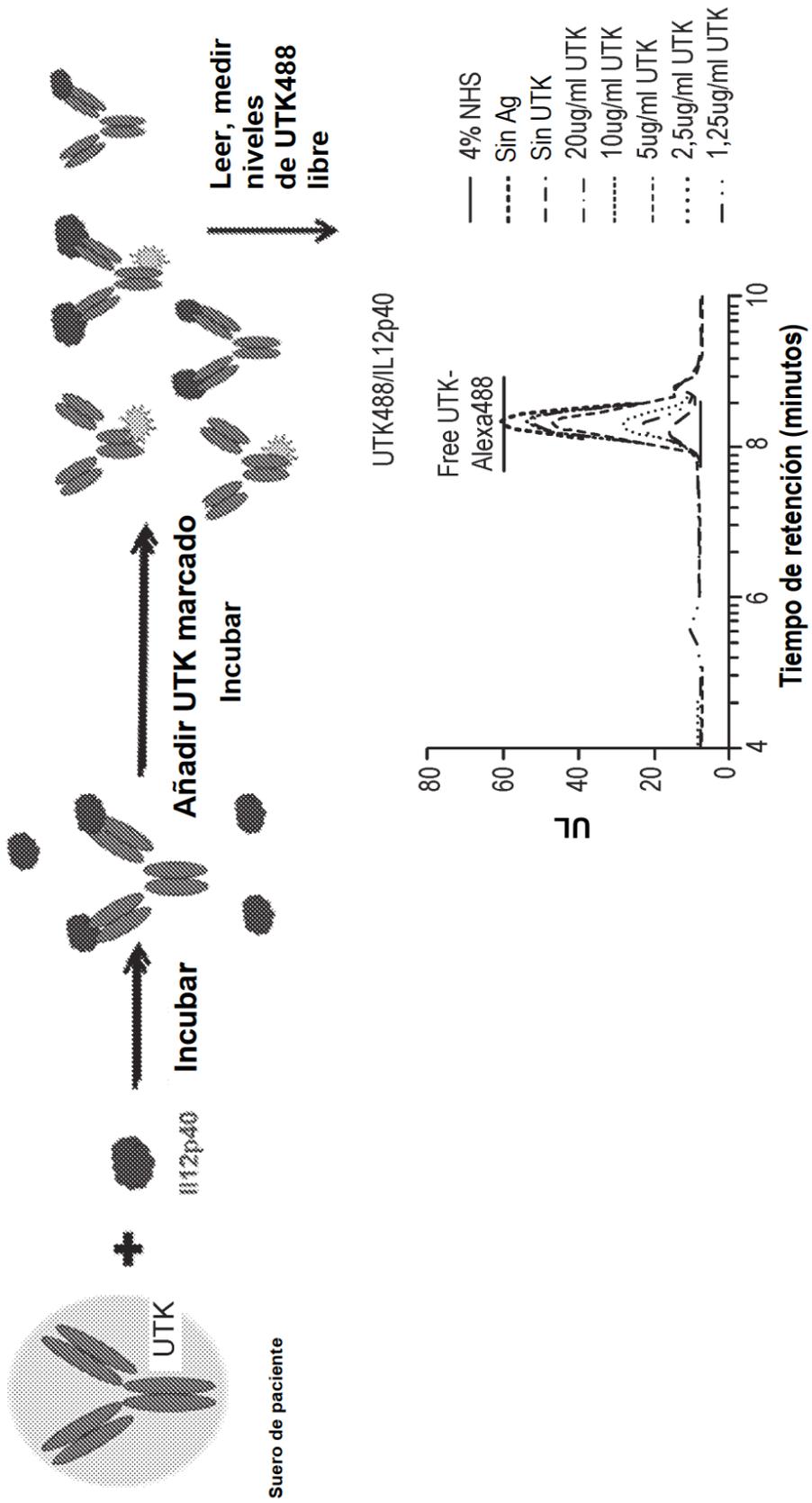


FIG. 16

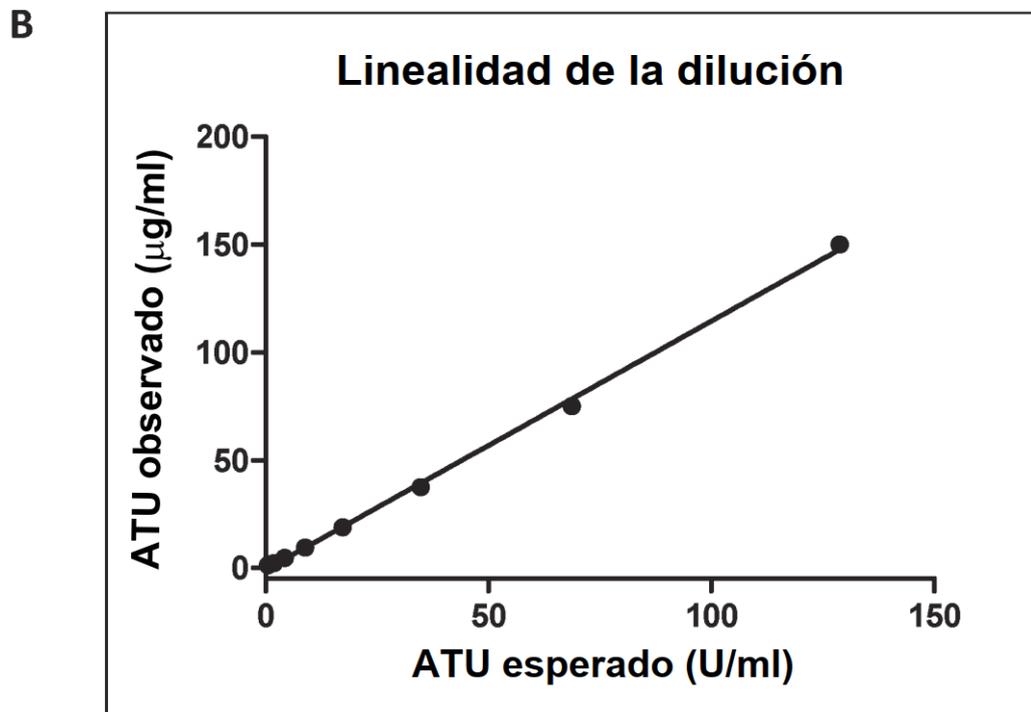
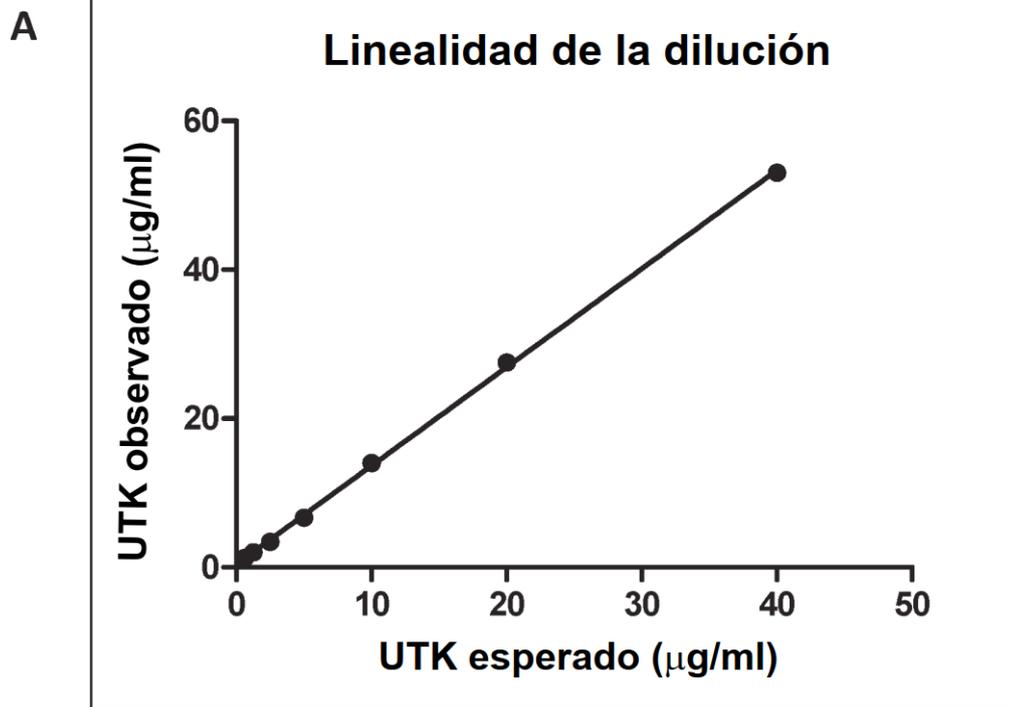


FIG. 17

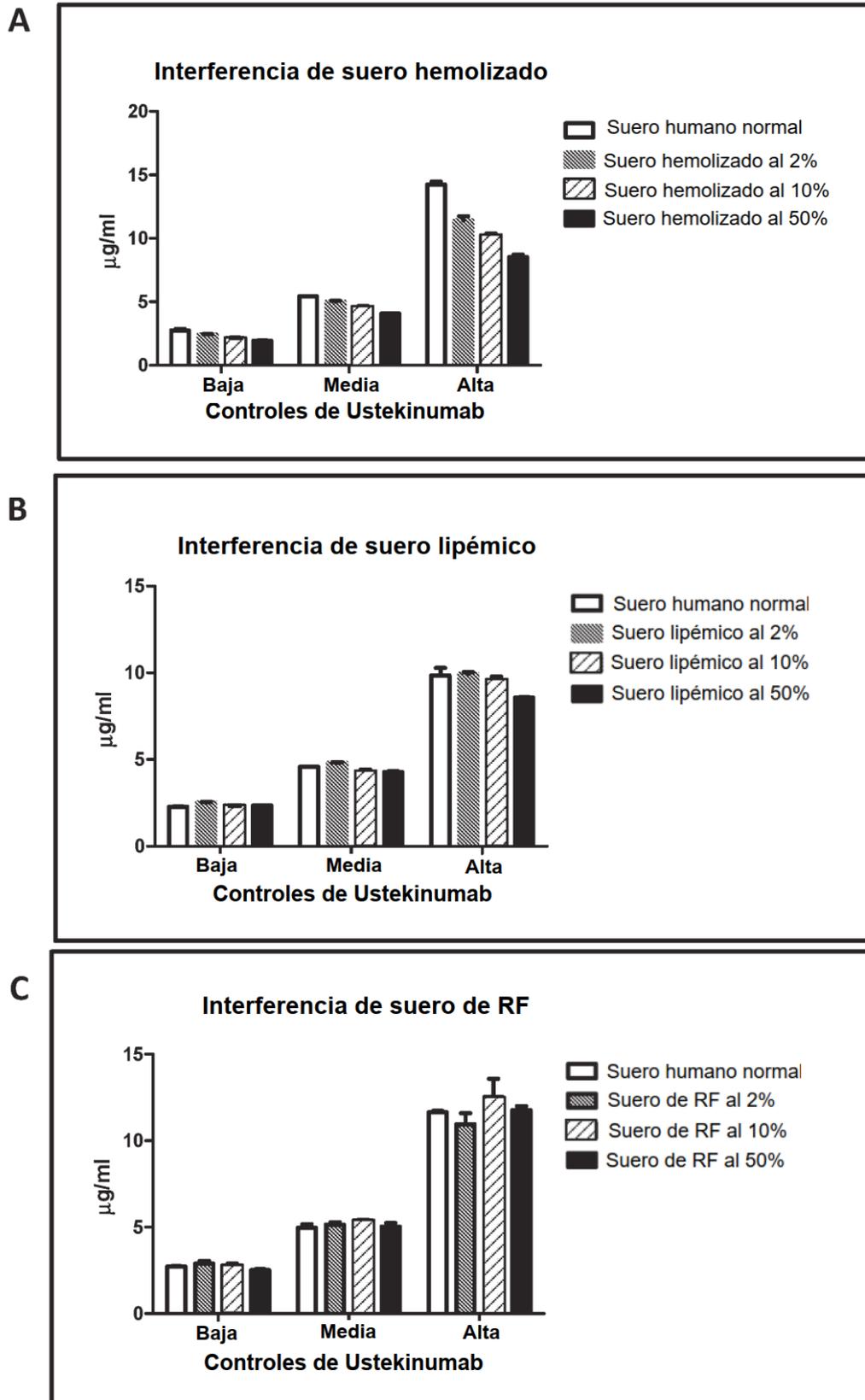


FIG. 18

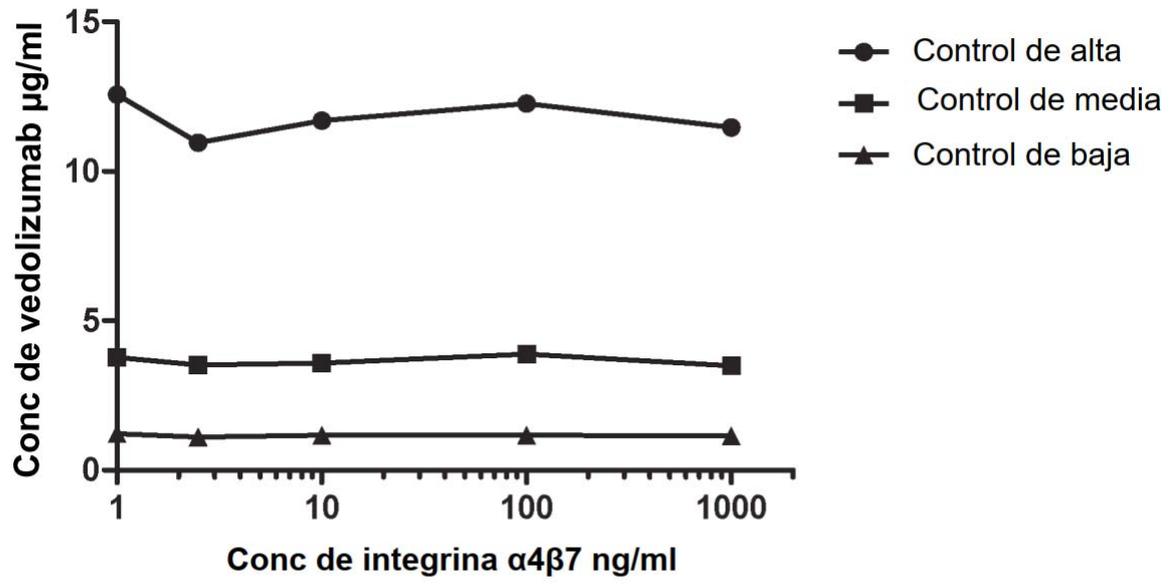


FIG. 19

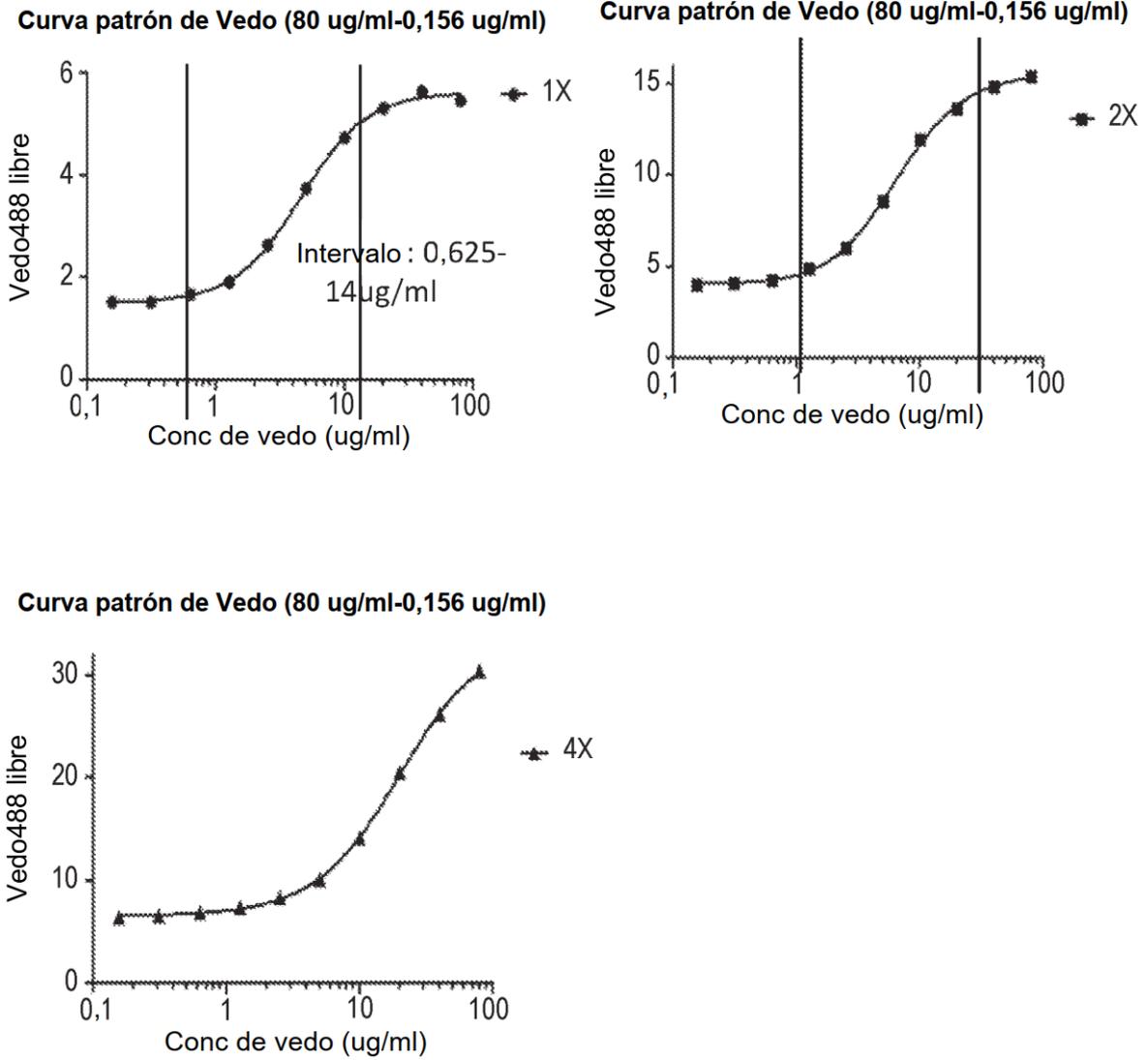


FIG. 20