

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 808**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2017** **E 17167959 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3239711**

54 Título: **Método para la medición de anticuerpos anti-fármaco**

30 Prioridad:

**27.04.2016 JP 2016089301**

**28.10.2016 WO PCT/JP2016/082135**

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

**11.06.2020**

73 Titular/es:

**JIMRO CO., LTD. (100.0%)**

**351-1, Nishiyokote-cho**

**Takasaki-shi, Gunma 370-0021, JP**

72 Inventor/es:

**KASHIWAGI, NOBUHITO;**

**SAITOH, FUMIO;**

**KANEDA, KENTA;**

**MAEGAWA, HIDETAKA y**

**YAGIHASHI, YUKO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 765 808 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**

Método para la medición de anticuerpos anti-fármaco

**5 [Campo de la invención]**

La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia o nivel de anticuerpos anti-fármaco (ADA) en una muestra.

**10 [Antecedentes de la invención]**

Los fármacos biológicos (en lo sucesivo, denominados "fármacos") tales como los fármacos proteicos, incluidos los fármacos de anticuerpos, derivados de un gen recombinante son fármacos derivados de un anticuerpo producido artificialmente o de una sustancia específicamente reactiva con una molécula o receptor relacionado con la enfermedad. El tratamiento dirigido molecularmente con un fármaco para controlar una molécula dirigida o similar relacionada con la causa de una enfermedad con una precisión exacta se ha utilizado ampliamente en los últimos años, y actualmente se han aprobado 47 fármacos de anticuerpos en Japón, EE. UU. y Europa. La mayoría de ellos van dirigidos al cáncer o a las enfermedades autoinmunitarias y muchos productos se han vuelto esenciales para el tratamiento de tales enfermedades.

20 Sin embargo, los fármacos de anticuerpos inducen la producción de ADA debido a que la respuesta inmunitaria de un paciente causa pérdida de respuesta (LOR), incluso si el fármaco de anticuerpos es un anticuerpo o sustancia humanizada, lo que complica desfavorablemente el control de la enfermedad. Por consiguiente, se requiere en la técnica un sistema de medición para detectar la presencia de ADA en una muestra de un paciente para el control de la terapia dirigida molecularmente con un fármaco y tener orientación para la toma de decisiones terapéuticas. Los fármacos no anticuerpos derivados de un gen recombinante o similar, como la eritropoyetina (bibliografía no de patente 1), y otros fármacos también están asociados a LOR o similar debido a la producción de ADA (bibliografía no de patente 2).

30 En el caso de infliximab (IFX), que es un fármaco de anticuerpo representativo dirigido al TNF- $\alpha$ , por ejemplo, los anticuerpos contra IFX (ATI) aparecen después de la administración. Con respecto a la medición de ATI, se conoce convencionalmente un método de medición de ATI mediante el uso de un ensayo de antígeno doble con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (bibliografía no de patente 3) y un método de cambio de movilidad donde se agrega un IFX marcado a una muestra pretratada y se utiliza HPLC para el resultante (bibliografía no de patente 4).

40 Sin embargo, el método de ensayo de antígeno doble, donde el ATI es capturado por IFX como un recubrimiento y el ATI capturado es detectado y medido con IFX marcado, puede verse influenciado por el IFX presente en un analito, lo que dificulta la medición precisa. El método de cambio de movilidad requiere la introducción de HPLC, que es un instrumento costoso y, por lo tanto, no es fácilmente aplicable.

**[Listado de citas bibliográficas]****[Bibliografía no de patente]**

- 45 [Bibliografía no de patente 1] Casadevall et al., N Engl J Med 2002; 346:469-475  
 [Bibliografía no de patente 2] Baker et al., Self/Nonsel 2010; 1: 314-322  
 [Bibliografía no de patente 3] Uri Kopylov et al., Inflamm Bowel Dis 2012; 18:1628-1633  
 [Bibliografía no de patente 4] Wang SL et al., J Immunol Methods. 2012 Aug 31; 382(1-2):177-88

50 M. Carrasco-Triguero et al., Journal of Immunology Research, Vol. 2016, páginas 1 a 14 divulga un método, denominado "UNISA" (inmunoensayo universal específico de especies indirectas), para detectar un anticuerpo de mono (ADA) producido por la administración de un anticuerpo IgG humano (fármaco de anticuerpo) a un mono. El método comprende inmovilizar un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana de ratón (anti-pan-Fc $\gamma$  humana: R10Z8E9), que tiene una reactividad cruzada extremadamente baja con un anticuerpo (IgG) de mono, en una placa ELISA como anticuerpo de captura, y detectar el anticuerpo de mono que se une a un anticuerpo IgG humano (fármaco de anticuerpo) y se captura con el anticuerpo de captura en la placa mediante el uso de un anticuerpo anti-IgG de mono de cabra marcado con enzima.

60 S. Swaminathan et al., Clinical Immunology, Vol. 148, n.º 2, páginas 177-185 divulga un subconjunto de pacientes con esclerosis múltiple recidivante-recurrente (RRMS) en tratamiento con interferón beta (IFN  $\beta$ ) que desarrollan anticuerpos anti-fármaco (ADA).

**[Sumario de la Invención]****65 [Problemas a resolver por la invención]**

La presente invención se refiere a proporcionar un método para medir los ADA que aparecen en un paciente que recibe terapia dirigida molecularmente con un fármaco o administración de mantenimiento de una citocina recombinante, hormona o similar de una manera más simple y precisa.

5

### **[Medios para resolver los problemas]**

Los presentes inventores investigaron en vista de tales circunstancias, y descubrieron que los ADA en un analito a medir se pueden medir con precisión al permitir que el complemento C1q o similar capture los ADA presentes en un analito en forma de un complejo inmunitario fármaco-ADA, y detectar y medir el complejo inmunitario fármaco-ADA capturado con un anticuerpo contra el fármaco correspondiente.

10

Específicamente, la presente invención se refiere a la materia objeto de las reivindicaciones 1 a 10, concretamente a las siguientes [1] a [10].

15

[1] Un método para medir anticuerpos anti-fármaco (ADA) en un analito a medir, comprendiendo el método:

20

(1) una etapa de proporcionar una muestra que comprende un analito para medir los ADA, comprendiendo la etapa añadir un fármaco correspondiente a un analito para medir los ADA para preparar una muestra con un complejo inmunitario fármaco-ADA formado;

20

(2) una etapa de poner en contacto la muestra preparada en la etapa (1) con un soporte recubierto con complemento C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q;

20

(3) una etapa de poner en contacto un anticuerpo anti-fármaco marcado o no marcado que reconoce específicamente el fármaco con el soporte recubierto preparado en la etapa (2); y

25

(4) una etapa de cuantificar la unión del complejo inmunitario fármaco-ADA al complemento C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q, donde una cantidad del fármaco a añadir en la etapa (1) es mayor que una cantidad de ADA en el analito a medir.

30

[2] El método de acuerdo con [1], donde el fármaco es un fármaco anti-TNF $\alpha$ .

[3] El método de acuerdo con [2], donde el fármaco es infliximab, adalimumab, golimumab, o certolizumab pegol.

[4] El método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [3], donde el fármaco es infliximab o adalimumab.

[5] El método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4], donde el anticuerpo que reconoce específicamente el fármaco a usar en la etapa (3) es un anticuerpo marcado.

35

[6] El método de acuerdo con [5], donde el anticuerpo marcado es un anticuerpo marcado con enzima.

35

[7] El método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [6], donde el analito a medir es un analito recogido de un paciente que recibe el fármaco.

[8] Un kit de medición de los ADA para medir los ADA utilizando el método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [7], comprendiendo el método de medición:

40

un soporte recubierto con complemento C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q; y un anticuerpo anti-fármaco marcado o no marcado que reconoce específicamente el fármaco.

40

[9] El kit de medición de acuerdo con [8], donde el anticuerpo que reconoce específicamente el fármaco es un anticuerpo marcado.

[10] El kit de medición de acuerdo con [9], que comprende además el fármaco.

45

### **[Efectos de la invención]**

El método de acuerdo con la presente invención permite la medición de ADA de una manera precisa y simple, sin verse influenciado por un fármaco presente en un analito. El control de ADA usando el método de acuerdo con la presente invención permite la determinación de la presencia o ausencia de la ocurrencia de LOR en el tratamiento dirigido molecularmente con un fármaco o similar, y por lo tanto se puede proporcionar un tratamiento más adecuado.

50

### **[Breve descripción de los dibujos]**

55

La FIG. 1-A es una lista de fármacos de anticuerpos (documento proporcionado por División de Química Biológica y Biológicos, Instituto Nacional de Ciencias de la Salud);

La FIG. 1-B muestra los fármacos biológicos aprobados por la FDA, excepto los fármacos de anticuerpos y las etapas de desarrollo de ADA de estos (Baker et al., Self/Nonself 2010; 1: 314-322, Tabla 1);

60

La FIG. 2 es un gráfico que muestra una curva dosis de ATI-respuesta (ELISA de ATI-C1q) y la especificidad;

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la concentración de ATI en cada analito, IFX(+): con adición de IFX, IFX(-): sin adición de IFX;

60

La FIG. 4 es un gráfico que muestra una curva dosis de ATI-respuesta (ELISA de ATI-Anti C3d MoAb) y la especificidad;

65

La FIG. 5 es un gráfico que muestra la concentración de ATI en cada analito, IFX(+): con adición de IFX, IFX(-): sin adición de IFX;

La FIG. 6 es un gráfico que muestra una curva dosis de ATA-respuesta (ELISA ATA-C1q) y la especificidad;

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la concentración de ATA en el plasma del paciente; aumento de la concentración de ATA con la adición de adalimumab al plasma de 5 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que perdieron la respuesta al adalimumab.

5 La FIG. 8 es un gráfico que muestra la influencia de la adición de calcio (Ca) al ELISA de ADA-C1q, (a) sistema de medida ELISA de IC-C1q, (b) sistema de medida ELISA de ATI-C1q, (c) curvas dosis-respuesta del ELISA de ATI-C1q, y (d) curvas dosis-respuesta del ELISA de ATA-C1q.

#### [Descripción detallada de las realizaciones preferidas]

10 En la presente invención, cuando se usa simplemente el término "fármaco", el término se refiere a uno de fármacos biológicos, incluidos los fármacos de anticuerpos, derivados de un gen recombinante.

15 En este caso, la expresión "fármaco de anticuerpo" se refiere a un fármaco que comprende un anticuerpo producido artificialmente que se une específicamente a una molécula relacionada con la enfermedad. Aunque la molécula objetivo no está limitada y se contemplan diversas moléculas específicas, incluidas las moléculas de la superficie celular tales como TNF- $\alpha$ , VEGF y CD20, los fármacos de anticuerpos dirigidos al TNF- $\alpha$  son adecuados. Infiximab, adalimumab, golimumab y certolizumab pegol son fármacos de anticuerpos dirigidos contra el TNF- $\alpha$  conocidos, y se prefiere infiximab entre ellos.

20 Aunque es aplicable cualquiera de los anticuerpos de ratón, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos, se prefieren los anticuerpos humanizados y los anticuerpos humanos.

25 A continuación se enumeran fármacos de anticuerpos aprobados en Japón, EE. UU. y Europa a fecha de abril de 2016. Los detalles se muestran en la FIG. 1-A. Los fármacos biológicos aprobados por la FDA, salvo los fármacos de anticuerpo se muestran en la FIG. 1-B.

30 Muromonab-CD3, ibritumomab tiuxetan, tositumomab yodo 131, catumaxomab, blinatumomab, abciximab, rituximab, basiliximab, infiximab, cetuximab, brentuximab vedotina, siltuximab, dinutuximab, obiltoximab, daclizumab, palivizumab, trastuzumab, gemtuzumab ozogamicina, alemtuzumab, omalizumab, efalizumab, bevacizumab, natalizumab, tocilizumab, ranibizumab, eculizumab, certolizumab pegol, mogamulizumab, pertuzumab, trastuzumab emtansina, obinutuzumab, vedolizumab, pembrolizumab, idarucizumab, mepolizumab, elotuzumab, daratumumab, ixekizumab, reslizumab, adalimumab, panitumumab, golimumab, ustekinumab, canakinumab, ofatumumab, denosumab, ipilimumab, belimumab, raxibacumab, ramucirumab, nivolumab, secukinumab, evolocumab, alirocumab, y necitumumab.

35 En la presente invención, el término "ADA" se refiere a anticuerpos que se producen cuando cualquiera de los fármacos de anticuerpos anteriores o cualquiera de los fármacos biológicos, excepto los fármacos de anticuerpos enumerados en la FIG. 1-B se administra a un humano y reconoce el fármaco.

40 La expresión "fármaco de anticuerpo" en la presente invención se refiere a un fármaco de anticuerpo especificado, y en este caso los ADA se refieren a anticuerpos contra el fármaco de anticuerpo especificado. En el caso de "infiximab (IFX)", ejemplos de los ADA incluyen anticuerpos contra infiximab (ATI: anticuerpos contra infiximab).

Ahora, se describirán las etapas (1) a (4) en el método para medir los ADA de acuerdo con la presente invención.

45 <Etapa (1)>

Esta etapa es una etapa de proporcionar una muestra que comprende un analito para medir los ADA.

50 En este caso, un analito a medir se refiere a un analito que posiblemente contenga ADA, y por ejemplo, es un analito recogido de un paciente que recibe un fármaco. Los ejemplos preferidos del analito a medir incluyen suero y plasma.

El analito puede diluirse, solubilizarse o concentrarse apropiadamente después de ser recogido de un paciente, de tal manera que la medición de acuerdo con la presente invención no se vea influenciada por ello.

55 Los ADA pueden estar presentes en el cuerpo de un paciente como un complejo inmunitario fármaco-ADA formado por la unión de un fármaco y ADA, o como ADA libres. En la presente invención, se añade una cantidad en exceso de un fármaco correspondiente a un analito para medir los ADA para preparar una muestra con un complejo inmunitario fármaco-ADA formado. Por lo tanto, se pueden medir los ADA totales, incluidos los ADA libres.

60 La muestra se puede preparar, específicamente, mezclando y agitando un fármaco y un analito juntos en un disolvente acuoso, por ejemplo, una solución tampón ácida (por ejemplo, solución tampón de citrato, solución tampón de fosfato, solución tampón de sal Tris o solución tampón de acetato, pH: aproximadamente de 5 a 9) a los que se ha agregado una proteína como albúmina de suero bovino (BSA) y caseína.

65 La cantidad de un fármaco correspondiente a usar puede ser cualquier cantidad suficiente para recuperar los ADA

del fármaco presente en el analito como un complejo inmunitario, y la cantidad de uso es, por ejemplo, por ejemplo, de 2 a 10 µg, y preferiblemente de 3 a 5 µg por 100 µl de un analito (suero o plasma).

5 El tiempo de reacción es normalmente de 16 a 24 horas, y preferiblemente de 18 a 20 horas. La temperatura de reacción es preferiblemente de 4 a 10 °C.

<Etapa (2)>

10 Esta etapa consiste en permitir que un soporte recubierto con el complemento C1q, anticuerpo anti-C3d o anticuerpo anti-C1q capture el complejo inmunitario fármaco-ADA en la muestra.

El complemento C1q, el anticuerpo anti-C3d y el anticuerpo anti-C1q son cada una de ellos moléculas conocidas por unirse a un complejo inmunitario en el flujo sanguíneo humano.

15 El complemento C1q, una proteína de aproximadamente 462 kDa compuesta de 18 subunidades (seis cadenas A, seis cadenas B y seis cadenas C), es un factor de configuración principal del primer factor C1 en la vía de activación del complemento, y reconoce un complejo antígeno-anticuerpo (Sunyer, J.O. and Lambris, J.D. (1999). Complement. Encyclopedia of Life Sciences).

20 El C1q se puede preparar usando un método conocido, como un método donde una solución cruda de C1q obtenida por dialización de suero o plasma se pone en contacto con un soporte insoluble recubierto de IgG, y luego el C1q adsorbido en el soporte insoluble se separa y se recoge (JP-A-H9-178745). Como alternativa, se puede usar C1q disponible comercialmente (por ejemplo, n.º de cat. C1740 de Sigma-Aldrich Co., LLC.).

25 El anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo que reconoce el C1q y es preferiblemente un anticuerpo monoclonal en la presente invención. El anticuerpo monoclonal anti-C1q está comercialmente disponible como MCA2603 en Bio-Rad AbD Serotec, Ltd., por ejemplo.

30 El anticuerpo anti-C3d es un anticuerpo que reconoce el complemento C3d y es preferiblemente un anticuerpo monoclonal en la presente invención. El anticuerpo monoclonal anti-C3d está comercialmente disponible como MCA2648 en BioRad AbD Serotec, Ltd., por ejemplo.

35 En el recubrimiento de un soporte con C1q, anticuerpo anti-C3d o anticuerpo anti-C1q, C1q, el anticuerpo anti-C3d o el anticuerpo anti-C1q se fija sobre un soporte insoluble normal, inerte.

40 Los ejemplos de dichos soportes incluyen soportes insolubles en forma de perlas, una microplaca, un tubo de ensayo, una barra, una pieza de ensayo de poliestireno, policarbonato, poliviniltolueno, polipropileno, polietileno, poli(cloruro de vinilo), nylon, polimetacrilato, látex, gelatina, agarosa, celulosa, sefarosa, vidrio, metal, cerámica, una sustancia magnética o similares.

45 El recubrimiento se puede lograr permitiendo que el C1q, el anticuerpo anti-C3d o el anticuerpo anti-C1q se unan a un soporte usando un método conocido, como un método de adsorción física, un método de unión química y una combinación de estos. Para recubrir un soporte con C1q, anticuerpo anti-C3d o anticuerpo anti-C1q, por ejemplo, una solución de C1q, solución de anticuerpo anti-C3d o solución de anticuerpo anti-C1q, ajustada hasta una concentración de 5 a 20 µg/ml con una solución tampón como PBS (solución salina tamponada con fosfato), se pone en contacto con un soporte y se hace reaccionar a una temperatura de 4 a 10 °C durante 16 a 24 horas.

50 Para inhibir la unión no específica al soporte, se prefiere en casos típicos realizar un tratamiento de bloqueo después de la finalización de la reacción mediante el uso de una solución de bloqueo que contenga una proteína como la albúmina de suero bovino (BSA) y caseína y un tensioactivo como Tween 20.

El contacto de una muestra con el soporte recubierto se puede lograr haciendo reaccionar, por ejemplo, a una temperatura de 4 a 10 °C durante 16 a 24 horas.

55 Una vez completada la reacción, el resultante se lava con una solución tampón o similar que contiene un tensioactivo como Tween 20 para eliminar las sustancias que no han reaccionado.

<Etapa (3)>

60 Esta etapa consiste en poner en contacto un anticuerpo marcado o no marcado con el fármaco correspondiente a los ADA (ADA para detección) con el soporte recubierto preparado en la etapa (2), haciéndolo reaccionar así con el complejo inmunitario fármaco-ADA que se une al C1q, anticuerpo anti-C3d o anticuerpo anti-C1q.

65 En este caso, el anticuerpo marcado o no marcado para el fármaco correspondiente a los ADA puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal que reconoce el fármaco (fármaco correspondiente a los ADA a medir), y dicho anticuerpo puede obtenerse usando un método común para producir un anticuerpo. Para el

anticuerpo, se puede usar no solo IgG sino también un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab', etc.).

5 Para obtener un anticuerpo policlonal, por ejemplo, un mamífero se inmuniza con un fármaco como antígeno, y se recoge sangre del mamífero, y luego se separa y purifica un anticuerpo de la sangre recogida. La inmunización se puede administrar a un mamífero como un ratón, hámster, cobaya, pollo, rata, conejo, perros, cabra, oveja y ganado. Los expertos en la materia conocen el método para la administración de un antígeno, y la vía de administración no está limitada, y puede elegirse apropiadamente entre administración subcutánea, administración intradérmica, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, etc. Además, se puede usar un adyuvante, según sea necesario. Después de que el mamífero inmunizado se mantiene durante un período apropiado, se toma una pequeña cantidad de suero, por ejemplo, de la vena del oído del mamífero, y se mide el título de anticuerpos. Si el título de anticuerpos aumenta, se puede administrar un antígeno para la inmunización de refuerzo de acuerdo con la situación. Uno o dos meses después de la administración final del antígeno, se recoge sangre del animal inmunizado utilizando un método convencional, y la sangre se separa y purifica utilizando un método convencional como la centrifugación, precipitación con sulfato de amonio o polietilenglicol, y cromatografía, tales como la cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad y, por lo tanto, los ADA policlonales se pueden obtener como antisueros policlonales.

20 Para obtener un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, se produce un hibridoma a través de la fusión celular de una célula productora de anticuerpos y una línea celular de mieloma. Los ejemplos de células productoras de anticuerpos aplicables incluyen esplenocitos, células de ganglios linfáticos y linfocitos B de un animal inmunizado.

25 Para producir un hibridoma, por ejemplo, se obtiene un esplenocito como una célula productora de anticuerpos de un animal inmunizado, y el esplenocito se fusiona con una célula de mieloma usando un método conocido (G. Kohler et al., Nature, 256, 495(1975)). Los ejemplos de cepas de célula de mieloma para la fusión celular incluyen, en el caso de un ratón, P3X63Ag8, la línea celular P3U1 y la línea celular Sp2/0. Se puede usar un acelerador de fusión como el polietilenglicol y un virus Sendai para la fusión celular, y se puede usar un medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) para la selección de un hibridoma después de la fusión celular de acuerdo con un método convencional. El hibridoma obtenido mediante fusión celular se clona usando un método de dilución limitante o similar.

35 La selección se realiza adicionalmente usando inmunoensayo enzimático con fármacos y, por lo tanto, se puede obtener una línea celular para producir un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un fármaco de interés. Para producir un anticuerpo monoclonal previsto a partir de un hibridoma, el hibridoma se cultiva usando un método de cultivo celular común o un método de formación de ascitis, y el anticuerpo monoclonal se puede purificar adecuadamente del sobrenadante de cultivo o ascitis. La purificación del anticuerpo monoclonal del sobrenadante de cultivo o ascitis se puede realizar de acuerdo con un método convencional. Por ejemplo, el fraccionamiento con sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc., se pueden usar apropiadamente en combinación.

40 Para los fármacos de anticuerpos enumerados en la siguiente Tabla 1, los anticuerpos monoclonales para los fármacos de anticuerpos están disponibles comercialmente en Bio-Rad AbD Serotec, Ltd. (Oxford, Reino Unido), y los productos comerciales pueden usarse en la presente invención.

45 [Tabla 1]

Fármaco de anticuerpo	Nombre comercial	Molécula diana	Indicaciones principales	Código del producto MoAb	
1	Infliximab	Remicade	TNF $\alpha$	colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide	HCA216P
2	Adalimumab	Humira	TNF $\alpha$	colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide	HCA232P
3	Golimumab	Simponi	TNF $\alpha$	colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide	HCA243
4	Tocilizumab	Actemra	IL-6R	artritis reumatoide, enfermedad de Castleman	HCA257P
5	Ustekinumab	Stelara	IL-12, IL-23-p40	psoriasis	HCA210P
6	Omalizumab	Xolair	IgE	asma	HCA235P
7	Natalizumab	Tysabri	integrina $\alpha$ 4	esclerosis múltiple	HCA249P
8	Rituximab	Rituxan	CD20	linfoma no de Hodgkin de linfocitos B	MCA2260P
9	Alemtuzumab	Campath	CD52	leucemia linfocítica crónica de linfocitos B	HCA175P
10	Cetuximab	Erbitux	EGFR	cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal	HCA228P

(continuación)

<b>Fármaco de anticuerpo</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Molécula diana</b>	<b>Indicaciones principales</b>	<b>Código del producto MoAb</b>	
11	Bevacizumab	Avastin	VEGF	cáncer colorrectal	HCA184P
12	Panitumumab	Vectibix	EGFR	cáncer colorrectal	HCA265
13	Palivizumab	Synagis	Proteína F del RSV	Infección por el virus RS	HCA262P
14	Trastuzumab	Herceptin	HER2	cáncer de mama metastásico	HCA176P

5 En el caso de que se use una forma marcada (ADA marcado) para la detección de ADA se puede usar como marcaje, por ejemplo, una enzima, un radioisótopo o una sustancia fluorescente usada convencionalmente para inmunoensayo. Sin embargo, se utiliza preferentemente una enzima. Los ejemplos de tales enzimas incluyen fosfatasa alcalina (ALP), peroxidasa (HRP),  $\beta$ -galactosidasa, ureasa, catalasa, glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa, microperoxidasa, quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, amilasa, fosforilasa, D-nasa y P-nasa.

10 Los ejemplos de los radioisótopos incluyen tritio,  $^{125}$ yodo y  $^{131}$ yodo y los ejemplos de la sustancia fluorescente incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC), isotiocianato de rodamina sustituido, isotiocianato de diclorotriazina, Alexa y AlexaFluoro.

15 El marcado con estos materiales de marcaje se puede realizar de acuerdo con un método conocido.

20 Cuando se añaden ADA marcados a un soporte recubierto, se prefiere añadir ADA marcados diluidos con un tampón que contenga una proteína como la albúmina sérica bovina (BSA) y caseína y un tensioactivo como Tween 20 (por ejemplo, Can Get Signal Solution 2 (n.º de cat. NKB-301, TOYOBO CO., LTD.)). Desde el punto de vista de la mejora de la sensibilidad de la detección para una molécula de antígeno (fármaco) en un complejo inmunitario derivado de ADA, se prefiere añadir iones de calcio como  $\text{CaCl}_2$  al tampón.

25 Las condiciones de reacción (unión) no están limitadas, y se emplean condiciones comunes normalmente utilizadas para tales métodos de medición. En los casos normales, la reacción se puede llevar a cabo adecuadamente, generalmente a 45 °C o menos, preferiblemente a temperatura ambiente, durante aproximadamente 1 a 5 horas.

Una vez completada la reacción, el resultante se lava con una solución tampón que contiene un tensioactivo como Tween 20 para eliminar los ADA que no han reaccionado.

30 <Etapa (4)>

Esta etapa consiste en cuantificar la unión del complejo inmunitario fármaco-ADA al C1q, anticuerpo anti-C3d o anticuerpo anti-C1q mediante la medición de la cantidad de anticuerpos contra un fármaco que se une al complejo inmunitario fármaco-ADA.

35 La medición de la cantidad de anticuerpos contra un fármaco correspondiente, es decir, ADA, se puede realizar utilizando un inmunoensayo conocido. El inmunoensayo representativo es el inmunoensayo enzimático (ELISA), y los ejemplos de inmunoensayos incluyen además los siguientes métodos de medición.

40 1. Método de quimioluminiscencia: MSD: La electroquimioluminiscencia se midió en el instrumento Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, Estados Unidos).

2. Inmuncromatografía: HMSA (ensayo de desplazamiento de la movilidad homogénea): sistema de HPLC Agilent Technologies serie 1200 (Santa Clara, CA). columna BioSep SEC-3000 (Phenomenex, Inc., (Torrance, CA).

45 3. BIAcore (Resonancia de plasmón): Biacore T100 Immunogenicity Package (GE Healthcare Bio-Sciences Gyros AB, Uppsala Suecia).

4. Método de fluorescencia:

50 4-1 Gyrolab. La fluorescencia se midió en la Estación de trabajo Gyrolab con el software Gyrolab Control (v5.4.0) (Gyros AB, Uppsala, Suecia).

4-2 AlphaLISA. La fluorescencia se midió en el instrumento Sinergy NEO (BioTek Instruments, Inc., Luzerna, Suiza).

55 5. Radioinmunoensayo (RIA)

6. Ensayo inmunoradiométrico (IRMA)

7. Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA)

8. Inmunturbidimetría (inmunonefelometría)

9. Turbidimetría de aglutinación con látex

10. Inmunoensayo de inhibición de aglutinación con látex  
 11. Inmunoensayo de fluorescencia con resolución temporal (TR-FIA)

5 En el caso de que un anticuerpo marcado se use como un anticuerpo contra un fármaco, por ejemplo, se mide la cantidad de una forma marcada, y la medición de una forma marcada se realiza usando un método de acuerdo con el marcaje. Específicamente, la actividad enzimática se mide para un marcador enzimático, la radiactividad se mide para un marcador radiactivo, y la intensidad de fluorescencia se mide para un marcador fluorescente.

10 Por ejemplo, se usa TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) como sustrato en el caso de que se use peroxidasa como enzima marcadora, o se usa fosfato de p-nitrofenilo como sustrato en el caso de que se use fosfatasa alcalina y la descomposición del sustrato se puede medir usando un espectrofotómetro o similar.

15 La cantidad de ADA en un analito se calcula a partir del valor cuantificado para un complejo inmunitario ADA-fármaco contenido en una muestra, basándose en una curva de calibración determinada a partir de los valores de medición para un complejo inmunitario fármaco-ADA formado en muestras de referencia.

El método de acuerdo con la presente invención permite la medición de ADA que se unen a un fármaco y/o ADA libres que no se unen a un fármaco, presentes en un analito.

20 Un kit de acuerdo con la presente invención es un kit de medición de ADA, comprendiendo el kit: un soporte recubierto al menos con C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q; y un anticuerpo marcado contra un fármaco correspondiente. El kit puede ser preferiblemente un kit para realizar el método descrito anteriormente para medir ADA.

25 El kit de acuerdo con la presente invención puede comprender además un fármaco especificado en la presente invención, y puede comprender adicionalmente, por ejemplo, un sustrato para la detección de un material de marcaje, un reactivo necesario para la medición, una solución diluyente, una solución tampón o una solución de lavado, según sea necesario.

30 Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención se basa en, como un principio de medición, la cuantificación de los ADA de interés derivados de un paciente a través de la captura de ADA en la muestra como un complejo inmunitario fármaco-ADA y el uso de ADA para la detección. Aunque, en los siguientes Ejemplos, se ilustrará la cuantificación de ADA mediante el uso de ELISA en el cual se captura un complejo inmunitario fármaco-ADA en el complemento C1q o anticuerpo anti-C3d como recubrimiento, se puede usar un gen recombinante, receptor del complemento, anticuerpo monoclonal, o similar, capaz de capturar C1q o un complejo inmunitario similar. Para el inmunoensayo, se pueden usar los diversos inmunoensayos mencionados anteriormente, analizadores automáticos y similares, además del ELISA. Por consiguiente, la presente invención no está limitada nunca a estos Ejemplos.

40 **[Ejemplos]**

**Ejemplo 1: Medición de anticuerpos contra infliximab (IFX) (ATI) <1>**

<Preparación de los reactivos>

45 1) PBS (solución salina tamponada con fosfato);

PBS(-): NaCl 137 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l, KHPO<sub>4</sub> 2 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mmol/l, pH 7,4

50 PBS(+): preparada añadiendo 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,33 mM de MgCl<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O a PBS(-)

2) Tampón de bloqueo;

A PBS(-), se añadieron 0,5 % de caseína hervida (durante 5 minutos) (n.º de cat. C7078, Sigma-Aldrich Co., LLC.), Tween 20 al 1 % y timerosal al 0,01 %.

55 1. Preparación de la placa recubierta con C1q

(1) C1q (n.º de cat. C1740, Sigma-Aldrich Co., LLC.) ajustado hasta una concentración de 10 µg/ml con PBS(-) se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (MaxisorpF8 x12, n.º de cat. 468667, Nunc) y la placa se dejó durante una noche a 4 °C.

60 (2) Las soluciones de C1q en la placa se descartaron y cada pocillo se lavó una vez con 300 µl de PBS(-) que contenía Tween 20 al 0,5 %.

(3) Después del lavado, se añadieron 300 µl del tampón de bloqueo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente, durante 1 hora. Tras la reacción, las soluciones se descartaron y la placa se secó en un flujo de aire durante 2 horas y de este modo se preparó una placa recubierta de C1q.

65

## 2. Preparación de las muestras

## (1) Preparación de las muestras de referencia

5 1) Se usaron anticuerpos anti-IgG humana como un sustituto de las muestras de referencia de los anticuerpos contra IFX (ATI).

10 La concentración de los anticuerpos anti-IgG (H+L) humana de conejo (n.º de cat. ab7155, Abcam plc.) se ajustó hasta 5 µg/ml con PBS(+) que contenía BSA al 0,1 % BSA (n.º de cat. A-3803, Sigma-Aldrich Co., LLC.), y se realizó adicionalmente una dilución en serie con PBS(+) que contiene BSA al 0,1 % para preparar materiales de referencia que tienen concentraciones de 0,078 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,312 µg/ml, 0,625 µg/ml, 1,25 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente.

15 2) Cada uno de los materiales de referencia que tienen las concentraciones respectivas en un volumen de 200 µl se añadió a un microtubo y a este se añadieron 50 µl de IFX (62,5 µg/ml; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) diluido con PBS(+) que contiene BSA al 0,1 % para mezclar entre sí y, a continuación, el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche, y de este modo se prepararon los materiales de referencia (complejo inmunitario (IFX-ATI).

## (2) Preparación de las soluciones de IFX

20 se descongeló IFX crioconservado a una concentración de 1 mg/ml y se diluyó en serie con PBS(+) que contiene BSA al 0,1 % para preparar soluciones de IFX que tienen concentraciones de 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

## (3) Preparación de soluciones de IgG humana agregada por calor (HAG-IgG)

25 La IgG humana (I4506, Sigma-Aldrich Co., LLC.) a una concentración de 5 mg/ml se calentó a 63 °C durante 20 minutos y se centrifugó a 10.000 xg durante 5 minutos, y el sobrenadante se recogió después y de este modo se preparó la HAG-IgG. La HAG-IgG se diluyó hasta 10 µg/ml con PBS(+) que contiene BSA al 0,1 % y se diluyó adicionalmente en serie para preparar soluciones de HAG-IgG que tienen concentraciones de 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente.

30

## 3. Inmunoensayo (ELISA de ATI-C1q)

35 (1) Cada uno de los materiales de referencia preparados en el punto 2(1) anterior, las soluciones de IFX preparadas en el punto 2(2) anterior y las soluciones de HAG-IgG preparadas en el punto 2(3) se dispensaron en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de la placa recubierta con C1q, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

40 (2) Posteriormente, se descartaron las soluciones de reacción y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % (n.º de cat. 1706531, Bio-Rad Laboratories, Inc) a cada pocillo, descartándose la solución, para lavar cada pocillo.

(3) El anticuerpo monoclonal anti-IFX humano marcado con HRP (n.º de cat. HCA216P, Bio-Rad AbD Serotec, Ltd.) se diluyó 1.000 veces con Can Get Signal Solution 2 (n.º de cat. NKB-301, TOYOBO CO., LTD.), y el resultante se dispuso en una cantidad de 100 µl en cada pocillo, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

45 (4) Tras la reacción, las soluciones se descartaron y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % a cada pocillo, descartándose a continuación la solución, para lavar cada pocillo.

50 (5) Se añadió una solución de sustrato TMB Blue (n.º de cat. S1601, Dako) en un volumen de 100 µl a cada pocillo, y el resultante se agitó, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente en condiciones de sombra durante 30 minutos.

(6) Después del desarrollo del color, se añadió a cada pocillo 50 µl de 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para terminar la reacción y la densidad óptica se midió a longitudes de onda de 450 nm/650 nm usando un lector de placas (absorciómetro para placas de 96 pocillos).

(7) Se determinó la curva de calibración (curva dosis-respuesta) de la muestra de referencia.

55

## 4. Resultados

60 A 2,5 µg/ml de ATI, la densidad óptica (D.O.) fue 1,99 y la curva de dosis-respuesta alcanzó una meseta (FIG. 2). En cambio, no se observó un claro aumento de la D.O. incluso al añadir la HAG-IgG que debía capturar el C1q a una concentración de 10 µg/ml o al añadir IFX a una concentración de 100 µg/ml.

Por consiguiente, la cantidad de ATI en un analito puede calcularse específicamente a partir de la densidad óptica del analito basándose en la curva de dosis-respuesta (curva de calibración).

65

**Ejemplo 2: Medición de los anticuerpos contra infliximab (ATI) en plasma del paciente <1>**

## 1. Preparación de las muestras

5 (1) El plasma recogido de un paciente que había experimentado la ocurrencia de falta de respuesta (LOR) al fármaco de anticuerpo, se diluyó 4 veces con PBS(+), y el plasma diluido se dispensó en una cantidad de 200 µl en un microtubo, al que se añadió adicionalmente 50 µl de IFX (62,5 µg/ml) diluido con PBS(+) que contenía BSA al 0,1 % o 50 µl de PBS(+) que contenía BSA al 0,1 % para mezclar entre sí y el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche (tasa de dilución final: 5 veces).

10 (2) Un analito de plasma combinado normal preparado mezclando muestras de plasma derivadas de cinco individuos sanos se diluyó 4 veces con PBS (+) de la misma manera que la preparación del analito de un paciente, y el plasma diluido se dispensó en una cantidad de 200 µl en un microtubo y se añadió adicionalmente 50 µl de IFX (62,5 µg/ml) diluido con PBS(+) que contenía BSA al 0,1 % o 50 µl de PBS(+) que contenía BSA al 15 0,1 % para mezclar entre sí y el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche (tasa de dilución final: 5 veces).

## 2. Inmunoensayo

20 Las muestras preparadas en los puntos 1(1) y 1(2) anteriores se dispensaron cada una en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa recubierta con C1q preparada de la misma manera que en el Ejemplo 1, y se hicieron reaccionar de acuerdo con el método ilustrado en 3. Inmunoensayo en el Ejemplo 1, y a continuación se determinó la cantidad de ATI en cada muestra basándose en la curva de calibración mostrada en la FIG. 2.

## 3. Resultados

25 Para el plasma de un paciente, la adición de IFX promovió aún más la formación de complejos inmunitarios IFX-ATI para dar como resultado un valor de medición mayor, y se obtuvieron valores de medición más bajos a medida que la tasa de dilución era mayor. Para el analito de plasma normal, por otra parte, no se detectaron ATI independientemente de si se había añadido IFX o no (FIG. 3).

30 A partir de estos resultados, se determinó que el método basado en la adición de IFX de acuerdo con la presente invención permite la medición de las cantidades o cantidad de ATI que se une a IFX y/o de ATI que no se une a IFX contenido en el plasma de un paciente.

**Ejemplo 3: Medición de anticuerpos contra infliximab (IFX) (ATI) <2>**

## &lt;Preparación de los reactivos&gt;

40 1) PBS (solución salina tamponada con fosfato);

PBS(-): NaCl 137 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l, KHPO<sub>4</sub> 2 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mmol/l, pH 7,4  
 PBS(+): preparada añadiendo 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,33 mM de MgCl<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O a PBS(-)

45 2) Tampón de bloqueo;

A PBS(-), se añadieron 0,5 % de caseína hervida (durante 5 minutos) (n.º de cat. C7078, Sigma-Aldrich Co., LLC.), Tween 20 al 1 % y timerosal al 0,01 %.

## 1. Preparación de una placa recubierta con anticuerpo monoclonal anti-Cd3

50 (1) Los anticuerpos monoclonales anti-Cd3 (Anti-C3d MoAb; n.º de cat. MCA2648, Bio-Rad AbD Serotec, Ltd.,) ajustados hasta una concentración de 1 µg/ml con PBS(-) se dispensaron en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (MaxisorpF8 x12, n.º de cat. 468667, Nunc) y la placa se dejó durante una noche a 4 °C. A continuación, la placa se lavó una vez.

55 (2) Después del lavado, se añadieron 300 µl del tampón de bloqueo a la misma y el resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente, durante 1 hora. Tras la reacción, las soluciones se descartaron y la placa se secó en un flujo de aire durante 2 horas y de este modo se preparó una placa recubierta de anticuerpo monoclonal anti-Cd3.

## 2. Preparación de las muestras

60 (1) Preparación de los materiales de referencia (complejo inmunitario IFX-ATI (ATI-IFX(Sueros)))

65 1) IFX en una concentración de 100 µg/100 µl/tubo y anticuerpos anti-IgG (H+L) humana de conejo (como sustitución de ATI) a una concentración de 100 µg/100 µl liofilizados ambos se mezclaron entre sí y se dejaron reaccionar a 4 °C durante 18 horas.

2) Tras la reacción, se añadieron 800 µl de suero combinado al 62 % de individuos sanos (diluido con solución

salina) hasta alcanzar una concentración de 100 µg/ml, y el resultante se dejó reaccionar a 37 °C durante 60 minutos.

3) Una vez completada la reacción, el resultante se diluyó 20 veces con BSA al 0,1 %/timerosal al 0,01 %/PBS(+) hasta alcanzar una concentración de 5 µg/ml, y de esta manera se obtuvo una solución de referencia de ATI. La solución de referencia de ATI se dispensó a razón de 500 µl/tubo y se crioconservó a -80 °C.

4) La solución de referencia de ATI (5 µg/ml) después de la crioconservación se descongeló y se tomaron 40 µl de la misma, a los cuales se añadió 960 µl de BSA al 0,1 %/timerosal al 0,01 %/PBS(+) hasta alcanzar 200 ng/ml. Además, la dilución en serie se realizó repetidamente para preparar materiales de referencia (ATI-IFX/Sueros) con concentraciones de 0 ng/ml, 3,125 ng/ml, 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml y 200 ng/ml, respectivamente.

#### (2) Preparación de las soluciones de IFX

se descongeló IFX crioconservado a una concentración de 1 mg/ml y se diluyó en serie con PBS(+) que contiene BSA al 0,1 % para preparar soluciones de IFX que tienen concentraciones de 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente.

#### (3) Preparación de soluciones de IgG humana agregada por calor (HAG-IgG)

La IgG humana (I4506, Sigma-Aldrich Co., LLC.) a una concentración de 5 mg/ml se calentó a 63 °C durante 20 minutos y se centrifugó a 10.000 xg durante 5 minutos, y el sobrenadante se recogió después y de este modo se preparó la HAG-IgG. La HAG-IgG se diluyó hasta 10 µg/ml con PBS(+) que contiene BSA al 0,1 % y se diluyó adicionalmente en serie para preparar soluciones de HAG-IgG que tienen concentraciones de 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente.

### 3. Inmunoensayo (ELISA de ATI-Anti C3d MoAb)

(1) Los materiales de referencia se dispensaron en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de la placa recubierta con anticuerpo monoclonal anti-Cd3 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

(2) Posteriormente, se descartaron las soluciones de reacción y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % (n.º de cat. 1706531, Bio-Rad Laboratories, Inc) a cada pocillo, descartándose la solución, para lavar cada pocillo.

(3) El anticuerpo monoclonal anti-IFX humano marcado con HRP (n.º de cat. HCA216P, Bio-Rad AbD Serotec, Ltd.) se diluyó 1.000 veces con Can Get Signal Solution 2 (n.º de cat. NKB-301, TOYOBO CO., LTD.), y el resultante se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

(4) Tras la reacción, las soluciones se descartaron y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % a cada pocillo, descartándose a continuación la solución, para lavar cada pocillo.

(5) Después del lavado, se añadió una solución de sustrato TMB Blue (n.º de cat. S1601, Dako) en un volumen de 100 µl a cada pocillo, y el resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente en condiciones de sombra durante 15 a 30 minutos.

(6) Después del desarrollo del color, se añadió 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 M para terminar la reacción y la densidad óptica se midió a dos longitudes de onda de 450 nm/650 nm usando un lector de placas (absorciómetro para placas de 96 pocillos).

(7) Se determinó la curva de calibración (curva dosis-respuesta) del materia de referencia.

### 4. Resultados

En la curva dosis-respuesta, la densidad óptica (D.O.) alcanzó un valor máximo de 2,1 a 200 ng/ml de ATI. En cambio, no se observó un claro aumento de la D.O. incluso al añadir IgG humana aglutinando por calor (HAG-IgG) para unirse al C3d a una concentración de 10 µg/ml o al añadir IFX a una concentración de 10 µg/ml (FIG. 4).

### **Ejemplo 4: Medición de los anticuerpos contra infliximab (ATI) en plasma del paciente <2>**

#### 1. Preparación de las muestras

A 120 µl de plasma recogido de un paciente con colitis ulcerosa que había experimentado la ocurrencia de LOR durante el tratamiento de mantenimiento con IFX, se añadió 360 µl de BSA al 0,1 %/timerosal al 0,01 %/PBS(+) para diluir 4 veces y el plasma diluido se dispensó en una cantidad de 200 µl en cada uno de dos microtubos y se añadieron 50 µl de IFX (125 µg/ml) preparado con BSA al 0,1 %/timerosal al 0,01 %/PBS(+) o 50 µl de BSA al 0,1 %/timerosal al 0,01 %/PBS(+) para mezclarse entre sí y el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche (tasa de dilución: 10 veces a 40 veces).

2. Inmunoensayo

Las muestras preparadas en el punto 1 anterior se dispensaron cada una en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa recubierta con anticuerpo monoclonal anti-Cd3 preparada de la misma manera que en el Ejemplo 3, y se hicieron reaccionar de acuerdo con el método ilustrado en 3. Inmunoensayo en el Ejemplo 3 y a continuación se determinó la cantidad de ATI en cada muestra basándose en la curva de calibración mostrada en la FIG. 4.

3. Resultados

Para el plasma de un paciente, la adición de IFX promovió aún más la formación de complejos inmunitarios de IFX para dar como resultado un valor de medición mayor, y se obtuvieron valores de medición más bajos a medida que la tasa de dilución era mayor (FIG. 5).

**Ejemplo 5: Medición de anticuerpos contra adalimumab (ATA) <1>**

<Preparación de los reactivos>

1) PBS (solución salina tamponada con fosfato);

PBS(-): NaCl 137 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l, KHPO<sub>4</sub> 2 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mmol/l, pH 7,4  
 PBS(+): preparada añadiendo 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,33 mM de MgCl<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O a PBS(-)

2) Tampón de bloqueo;

A PBS(-), se añadieron 0,5 % de caseína hervida (durante 5 minutos) (n.º de cat. C7078, Sigma-Aldrich Co., LLC.), Tween 20 al 1 % y timerosal al 0,01 %.

3) Diluyente;

Preparado añadiendo BSA al 0,1 % y timerosal al 0,01 % a PBS(+).

1. Preparación de la placa recubierta con C1q

(1) C1q (n.º de cat. C1740, Sigma-Aldrich Co., LLC.) ajustado hasta una concentración de 10 µg/ml con PBS(-) se dispuso en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (MaxisorpF8 x12, n.º de cat. 468667, Nunc) y la placa se dejó durante una noche a 4 °C.

(2) Las soluciones de C1q en la placa se descartaron y cada pocillo se lavó una vez con 300 µl de PBS(-) que contenía Tween 20 al 0,5 %.

(3) Después del lavado, se añadieron 300 µl del tampón de bloqueo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente, durante 1 hora. Tras la reacción, las soluciones se descartaron y la placa se secó en un flujo de aire durante 2 horas y de este modo se preparó una placa recubierta de C1q.

2. Preparación de las muestras

(1) Preparación de las muestras de referencia

1) Se usaron anticuerpos anti-IgG humana como un sustituto de las muestras de referencia de los anticuerpos contra adalimumab (ATA). La concentración de los anticuerpos anti-IgG (H+L) humana de conejo (n.º de cat. ab7155, Abcam plc.) se ajustó hasta 400 ng/ml con el diluyente y se realizó adicionalmente una dilución en serie con el diluyente para preparar materiales de referencia que tienen concentraciones de 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml y 400 ng/ml, respectivamente.

2) Cada uno de los materiales de referencia que tienen las concentraciones respectivas en un volumen de 200 µl se añadió a un microtubo y a este se añadieron 50 µl de adalimumab (125 µg/ml; Eisai Co., Ltd.) diluido con diluyente para mezclar entre sí y, a continuación, el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche, y de este modo se prepararon los materiales de referencia (complejos inmunitarios ATA-adalimumab).

(2) Preparación de soluciones de adalimumab y soluciones de IFX

Se descongeló IFX y adalimumab crioconservados a una concentración de 1 mg/ml y se diluyeron en serie con el diluyente para preparar soluciones de IFX y soluciones de adalimumab que tienen concentraciones de 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 40 µg/ml, respectivamente.

(3) Preparación de soluciones de IgG humana agregada por calor (HAG-IgG)

La IgG humana (I4506, Sigma-Aldrich Co., LLC.) a una concentración de 5 mg/ml se calentó a 63 °C durante 20 minutos y se centrifugó a 10.000×g durante 5 minutos, y el sobrenadante se recogió después y de este modo se

preparó la HAG-IgG. La HAG-IgG se diluyó hasta 40 µg/ml con el diluyente y se diluyó adicionalmente en serie para preparar soluciones de HAG-IgG que tienen concentraciones de 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 40 µg/ml, respectivamente.

### 5 3. Inmunoensayo (ELISA de ATA-C1q)

(1) Los materiales de referencia preparados en el punto 2(1) anterior se dispensaron en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de la placa recubierta con C1q y se dejó reaccionar a 25 °C durante 2 horas con agitación usando un mezclador de placas.

10 (2) Posteriormente, se descartaron las soluciones de reacción y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % (n.º de cat. 1706531, Bio-Rad Laboratories, Inc) a cada pocillo, descartándose la solución, para lavar cada pocillo.

15 (3) El anticuerpo monoclonal anti-adalimumab humano marcado con HRP (n.º de cat. HCA204P, Bio-Rad AbD Serotec, Ltd.) se diluyó 2.000 veces con Can Get Signal Solution 2 (n.º de cat. NKB-301, TOYOBO CO., LTD.), y el resultante se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

(4) Tras la reacción, las soluciones se descartaron y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % a cada pocillo, descartándose a continuación la solución, para lavar cada pocillo.

20 (5) Se añadió una solución de sustrato TMB Blue (n.º de cat. S1601, Dako) en un volumen de 100 µl a cada pocillo, y el resultante se agitó, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente en condiciones de sombra durante 30 minutos.

(6) Después del desarrollo del color, se añadió a cada pocillo 50 µl de 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para terminar la reacción y la densidad óptica se midió a longitudes de onda de 450 nm/650 nm usando un lector de placas (absorciómetro para placas de 96 pocillos).

25 (7) Se determinó la curva de calibración (curva dosis-respuesta) de la muestra de referencia.

### 4. Resultados

30 A 200 ng/ml de ATA, la densidad óptica (D.O). fue 1,863 y la curva de dosis-respuesta alcanzó una meseta (FIG. 6). En cambio, no se observó un claro aumento de la D.O. incluso al añadir la IgG aglutinante por calor (HAG-IgG) que debía capturar el C1q a una concentración de 40 µg/ml o al añadir adalimumab a una concentración de 40 µg/ml.

35 Por consiguiente, se determinó que la cantidad de ATA en un analito puede calcularse específicamente a partir de la densidad óptica del analito basándose en la curva de dosis-respuesta (curva de calibración).

### **Ejemplo 6: Medición de los anticuerpos contra adalimumab (ATA) en plasma del paciente <2>**

#### 1. Preparación de las muestras

40 A 120 µl de plasma recogido de cinco pacientes (cinco casos) con enfermedad inflamatoria del intestino que habían experimentado la ocurrencia de LOR al tratamiento de mantenimiento con adalimumab, se añadió 360 µl del diluyente para diluir 4 veces y el plasma diluido se dispensó en una cantidad de 200 µl en cada uno de dos microtubos y se añadieron 50 µl de adalimumab (125 µg/ml) preparado con el diluyente o 50 µl del diluyente para mezclarse entre sí y el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche (tasa de dilución final: 5 veces).

#### 2. Inmunoensayo

50 Las muestras preparadas en el punto 1 anterior se dispensaron cada una en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa recubierta con C1q preparada de la misma manera que en el Ejemplo 5, y se hicieron reaccionar de acuerdo con el método ilustrado en 3. Inmunoensayo en el Ejemplo 5 y a continuación se determinó la cantidad de ATA en las muestras basándose en la curva de calibración mostrada en la FIG. 6.

#### 3. Resultados

55 Para el plasma de los cinco pacientes que desarrollaron LOR a adalimumab, la adición de adalimumab promovió aún más la formación de complejos inmunitarios de adalimumab-ATA para dar como resultado valores de medición significativamente más altos que aquellos sin adición de adalimumab (P = 0,0063) (Figura 7).

60 A partir de estos resultados, se determinó que el método basado en la adición de adalimumab de acuerdo con la presente invención permite la medición de las cantidades o cantidad de ATA que se une a adalimumab y/o de ATA que no se une a adalimumab contenido en el plasma de un paciente.

### **Ejemplo 7: Influencia de la adición de calcio (Ca) en el ELISA de ADA-C1q**

65 7-1. Influencia de la adición de calcio en el sistema de medida ELISA de ADA-C1q

<Preparación de los reactivos>

1) PBS (solución salina tamponada con fosfato);

5 PBS(-): NaCl 137 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l, KHPO<sub>4</sub> 2 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mmol/l, pH 7,4

2) Tampón de bloqueo;

10 A PBS(-), se añadieron 0,5 % de caseína hervida (durante 5 minutos) (n.º de cat. C7078, Sigma-Aldrich Co., LLC.), Tween 20 al 1 % y timerosal al 0,01 %.

3) Diluyente;

15 Preparado añadiendo BSA al 0,1 % y timerosal al 0,01 % a PBS(-).

4) Diluyentes con CaCl<sub>2</sub>;

Preparados añadiendo CaCl<sub>2</sub> al diluyente para alcanzar 0,3 mM, 0,6 mM, o 0,9 mM.

20

1. Preparación de la placa recubierta con C1q

(1) C1q (n.º de cat. C1740, Sigma-Aldrich Co., LLC.) ajustado hasta una concentración de 10 µg/ml con PBS(-) se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (MaxisorpF8 x12, n.º de cat. 468667, Nunc) y la placa se dejó durante una noche a 4 °C. La placa resultante se usó como una placa ELISA para medir ATI y ATA. Para la medición comparativa de un complejo inmunitario usando una placa recubierta con C1q preparada de acuerdo con un método descrito por Hey et al. (Bibliografía no de patente 5), se recubrió de forma similar una placa ELISA de 96 pocillos con 5 µg/ml de C1q.

(2) Las soluciones de C1q en la placa se descartaron y cada pocillo se lavó una vez con 300 µl de PBS(-) que contenía Tween 20 al 0,5 %.

(3) Después del lavado, se añadieron 300 µl del tampón de bloqueo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente, durante 1 hora. Tras la reacción, las soluciones se descartaron y la placa se secó en un flujo de aire durante 2 horas y de este modo se preparó una placa recubierta de C1q.

35 2. Preparación de las muestras

(1) Preparación de las muestras de referencia

40 Se usaron anticuerpos anti-IgG humana como un sustituto de las muestras de referencia de los anticuerpos contra IFX (ATI).

A 50 µl de anticuerpos anti-IgG (H+L) humana de conejo (n.º de cat. ab7155, Abcam plc.), se añadió 100 µl de IFX (1 mg/ml) y a esto se añadió adicionalmente 850 µl de PBS(-) hasta alcanzar 1 ml y el resultante se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche.

45 Tras la reacción, se extrajeron alícuotas de 5 µl y se añadieron los diluyentes, cada uno en un volumen de 995 µl con CaCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones, a las alícuotas para una dilución de 200 veces, obteniéndose así una concentración de ATI de 500 ng/ml.

50 (2) Preparación de soluciones de IgG humana agregada por calor (HAG-IgG)

La IgG humana (I4506, Sigma-Aldrich Co., LLC.) a una concentración de 4 mg/ml se calentó a 63 °C durante 20 minutos y se centrifugó a 10.000 xg durante 5 minutos, y el sobrenadante se recogió después y de este modo se preparó la HAG-IgG. A partir de esto, se extrajo 10 µl de la HAG-IgG y se añadió a la misma 990 µl de PBS(-), obteniéndose así una concentración de 40 µg/ml. Se extrajeron alícuotas de 5 µl y se añadieron los diluyentes, cada uno en un volumen de 995 µl con CaCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones, a las alícuotas para una dilución de 200 veces, obteniéndose así 200 ng/ml de HAG-IgG.

60 3. Inmunoensayo

(A) ELISA de los complejos inmunitarios (IC) usando un método de C1q recubierto y concentración de Ca

(1) La solución de HAG-IgG (200 ng/ml) preparada en el punto 2(2) anterior se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de la placa recubierta con C1q y se dejó reaccionar a 25 °C durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

(2) Posteriormente, se descartaron las soluciones de reacción y se repitió cuatro veces un procedimiento en el

cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % (n.º de cat. 1706531, Bio-Rad Laboratories, Inc) a cada pocillo, descartándose la solución, para lavar cada pocillo.

(3) El anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con HRP (ab81202, Abcam plc.) se diluyó 16.000 veces con una solución preparada añadiendo caseína al 0,5 % a PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % y el resultante se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo y se dejó reaccionar a 25 °C durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

(4) Tras la reacción, las soluciones se descartaron y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % a cada pocillo, descartándose a continuación la solución, para lavar cada pocillo.

(5) Se añadió una solución de sustrato TMB Blue (n.º de cat. S1601, Dako) en un volumen de 100 µl a cada pocillo, y el resultante se agitó, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente en condiciones de sombra durante 30 minutos.

(6) Después del desarrollo del color, se añadió a cada pocillo 50 µl de 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para terminar la reacción y la densidad óptica se midió a longitudes de onda de 450 nm/650 nm usando un lector de placas (absorciómetro para placas de 96 pocillos).

#### (B) ELISA de ATI-C1q y concentración de Ca

(1) El material de referencia de ATI (500 ng/ml) preparado en el punto 2(1) anterior se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de la placa recubierta con C1q y se dejó reaccionar a 25 °C durante 2 horas con agitación usando un mezclador de placas.

(2) Posteriormente, se descartaron las soluciones de reacción y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % (n.º de cat. 1706531, Bio-Rad Laboratories, Inc) a cada pocillo, descartándose la solución, para lavar cada pocillo.

(3) El anticuerpo monoclonal anti-infliximab humano marcado con HRP (n.º de cat. HCA216P, Bio-Rad AbD Serotec, Ltd.) se diluyó 1.000 veces con Can Get Signal Solution 2 (n.º de cat. NKB-301, TOYOBO CO., LTD.), y el resultante se dispensó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo, y se dejó reaccionar a 25 °C durante 1 hora con agitación usando un mezclador de placas.

(4) Tras la reacción, las soluciones se descartaron y se repitió cuatro veces un procedimiento en el cual se añadió 300 µl de PBS(-) que contiene Tween 20 al 0,5 % a cada pocillo, descartándose a continuación la solución, para lavar cada pocillo.

(5) Se añadió una solución de sustrato TMB Blue (n.º de cat. S1601, Dako) en un volumen de 100 µl a cada pocillo, y el resultante se agitó, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente en condiciones de sombra durante 30 minutos.

(6) Después del desarrollo del color, se añadió a cada pocillo 50 µl de 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para terminar la reacción y la densidad óptica se midió a longitudes de onda de 450 nm/650 nm usando un lector de placas (absorciómetro para placas de 96 pocillos).

#### 4. Resultados

Incluso en el caso en el que se añadió CaCl<sub>2</sub> a 200 ng/ml de HAG-IgG en la medición, el aumento de la densidad óptica no estaba suficientemente claro (FIG. 8-A). En el caso en el que se añadió CaCl<sub>2</sub> al sistema de medición del ELISA de ATI-C1q con la muestra de referencia que tenía una concentración de 500 ng/ml, por el contrario, la densidad óptica aumentó de manera dependiente de la dosis y alcanzó una meseta a una concentración de 0,6 mM (FIG 8-B). Por consiguiente, se espera que la adición de CaCl<sub>2</sub> a un sistema de medición de ELISA de ATI-C1q dote al sistema de medición de una mayor sensibilidad y estabilidad.

#### 7-2. Influencia de la adición de Ca sobre la curva dosis-respuesta del ELISA de ADA-C1q

##### <1> Curva dosis-respuesta del ELISA de ADA-C1q y adición de Ca

##### 1. Preparación de las muestras

##### Preparación de las muestras de referencia

A 10 µl de anticuerpos anti-IgG (H+L) humana de conejo (2 mg/ml, n.º de cat. ab7155, Abcam plc.), se añadió 20 µl de IFX (1 mg/ml) y a esto se añadió adicionalmente 470 µl del diluyente o el diluyente con CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM y las soluciones de los dos tipos de diluyentes se dejaron reaccionar a 4 °C durante la noche.

Tras la reacción, se añadió 500 µl de cada diluyente hasta alcanzar una concentración de 20 µg/ml, y de estos se extrajeron 100 µl, y a esto se añadió 900 µl de cada diluyente hasta alcanzar una concentración de 2 µg/ml. De esto se extrajo 500 µl y se diluyó en serie con cada diluyente para preparar los materiales de referencia que tienen concentraciones de 31,25 ng/ml, 62,5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1.000 ng/ml y 2.000 ng/ml, respectivamente.

2. Inmunoensayo

5 Las muestras preparadas en el punto 1 anterior se dispensaron en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa recubierta con C1q preparada de la misma manera que en 1. Preparación de la placa recubierta con C1q de "7-1" descrita anteriormente y que reaccionó de acuerdo con el método ilustrado en 3. Inmunoensayo en el Ejemplo 7 y después se midió la densidad óptica de las muestras de referencia.

3. Resultados

10 La adición de CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM al diluyente del sistema de medición proporcionó densidades ópticas en la curva dosis-respuesta 1,5 a 4 veces mayores que en el caso de no adición de CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM, proporcionando así una mayor sensibilidad (FIG. 8-C).

<2> Curva dosis-respuesta del ELISA de ATA-C1q y adición de Ca

15 1. Preparación de las muestras

Preparación de las muestras de referencia

20 Se usaron anticuerpos anti-IgG humana como un sustituto de las muestras de referencia de los anticuerpos contra adalimumab (ATA).

25 A 10 µl de anticuerpos anti-IgG (H+L) humana de conejo (2 mg/ml, n.º de cat. ab7155, Abcam plc.), se añadió 20 µl de adalimumab (1 mg/ml) y a esto se añadió adicionalmente 470 µl del diluyente o el diluyente con CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM y las soluciones de los dos tipos de diluyentes se dejaron reaccionar a 4 °C durante la noche.

30 Tras la reacción, se añadió 500 µl de cada diluyente hasta alcanzar una concentración de 20 µg/ml, y de estos se extrajeron 10 µl, y a esto se añadió 990 µl de cada diluyente hasta alcanzar una concentración de 200 ng/ml. De esto se extrajo 500 µl y se diluyó en serie con cada diluyente para preparar los materiales de referencia que tienen concentraciones de 1,56 ng/ml, 3,125 ng/ml, 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente.

2. Inmunoensayo

35 Las muestras preparadas en el punto 1 anterior se dispensaron en una cantidad de 100 µl en cada pocillo de una placa recubierta con C1q preparada de la misma manera que en 1. Preparación de la placa recubierta con C1q de "7-1" descrita anteriormente y que reaccionó de acuerdo con el método ilustrado en 3. Inmunoensayo en el Ejemplo 5 y después se midió la densidad óptica de las muestras de referencia.

40 3. Resultados

La adición de CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM al diluyente del sistema de medición proporcionó densidades ópticas de 2 a 4 veces mayores que en el caso de no adición de CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM, proporcionando así una mayor sensibilidad (FIG. 8-D).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para medir anticuerpos anti-fármaco (ADA) en un analito a medir, comprendiendo el método:
  - 5 (1) una etapa de proporcionar una muestra que comprende un analito para medir los ADA, comprendiendo la etapa añadir un fármaco correspondiente a un analito para medir los ADA para preparar una muestra con un complejo inmunitario fármaco-ADA formado;
  - (2) una etapa de poner en contacto la muestra preparada en la etapa (1) con un soporte recubierto con complemento C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q;
  - 10 (3) una etapa de poner en contacto un anticuerpo anti-fármaco marcado o no marcado que reconoce específicamente el fármaco con el soporte recubierto preparado en la etapa (2); y
  - (4) una etapa de cuantificar la unión del complejo inmunitario fármaco-ADA al complemento C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q,
- 15 donde una cantidad del fármaco a añadir en la etapa (1) es mayor que una cantidad de los ADA en el analito a medir.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fármaco es un fármaco anti-TNF $\alpha$ .
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el fármaco es infliximab, adalimumab, golimumab, o certolizumab pegol.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el fármaco es infliximab o adalimumab.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el anticuerpo que reconoce específicamente el fármaco a usar en la etapa (3) es un anticuerpo marcado.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el anticuerpo marcado es un anticuerpo marcado con enzima.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el analito a medir es un analito recogido de un paciente que recibe el fármaco.
- 35 8. Un kit de medición de los ADA para medir los ADA utilizando el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método de medición:  
un soporte recubierto con complemento C1q, anticuerpo anti-C3d, o anticuerpo anti-C1q; y un anticuerpo anti-fármaco marcado o no marcado que reconoce específicamente el fármaco.
- 40 9. El kit de medición de acuerdo con la reivindicación 8, donde el anticuerpo que reconoce específicamente el fármaco es un anticuerpo marcado.
10. El kit de medición de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además el fármaco.

[FIG. 1-A]

Clasificación	Nombre	Nombre comercial	Estructura	Diana	Indicaciones principales	Año de aprobación			Célula productora	
						EE. UU.	UE	Japón		
Anticuerpo de ratón	muronomab-CD3	Orthoclone OKT3	IgG2a	CD3	rechazo agudo tras trasplante de riñón	1986	NA	1991	hibridoma de ratón	
	ibritumomab tiuxetan	Zevalin	IgG1k (MX-DTPA; marcado con <sup>90</sup> Y)	CD20	linfoma no Hodgkin de linfocitos B	2002	2004	2008	CHO	
	Tositumomab yodo 131	Bexxar	IgG2aλ (marcado con <sup>131</sup> I)	CD20	linfoma no Hodgkin	2003	NA	NA	célula de mamífero	
Anticuerpo químico	catumaxomab	Removab	mIgG2aκ (EpCAM), rIgG2bλ (CD3)	EpCAM, CD3	ascitis cancerosa	NA	2009	NA	hibridoma de rata/ratón	
	blinatumomab	Blincyfo	scFv-scFv	CD19, CD3	leucemia linfocítica aguda	2014	2015	NA	CHO	
	abxkumab	ReoPro	IgG1 (Feb)	GP1Ib/IIla	isquemia miocárdica	1994	NA	NA	célula de mamífero	
	rituximab	Rituxan/MabThera	IgG1k	CD20	linfoma no Hodgkin de linfocitos B	1997	1998	2001	CHO	
	bezlincumab	Simulect	IgG1k	CD25	rechazo agudo tras trasplante de riñón	1998	1998	2002	Sp 2/0	
	infliximab	Remicade	IgG1k	TNFα	artritis reumatoide	1998	1999	2002	Sp 2/0	
	cetuximab	Erlotinib	IgG1k	EGFR	cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal	2004	2004	2008	Sp 2/0	
	brentuximab vedotina	Adcetris	IgG1(modificada con MMAE)	CD30	linfoma de Hodgkin	2011	2012	2014	CHO	
	siltuximab	Sylvant	IgG1k	IL-6	enfermedad de Castleman	2014	2014	NA	CHO	
	dinutuximab	Urituximab	IgG1k	IL-6	neuroblastoma (niños)	2015	2015	NA	Sp 2/0	
Anticuerpo humanizado	oblitoximab	Anihim	IgG1k	B. anthracis tc	antrax por inhalación	2015	NA	NA		
	daclizumab	Zenapax	IgG1k	CD25	rechazo agudo tras trasplante de riñón	1997	1999	NA	NS0	
	palivizumab	Synagis	IgG1k	proteína F del RSV	infección por el virus RS	1998	1998	2002	NS0	
	fraxilzumab	Herceptin	IgG1k	HER2	cáncer de mama metastásico	1998	2000	2001	CHO	
	gemtuzumab ozogamicina	Mylotarg	IgG4κ (modificada con caliquemina)	CD33	leucemia mieloide aguda	2000	re/fuec	2005	NS0	
	afomzumab	Cemparin	IgG1k	CD52	leucemia linfocítica crónica de linfocitos B	2001	2001	2014	CHO	
	omalizumab	Xolair	IgG1k	IgE	asma	2003	2005	2009	CHO	
	ofatumumab	Rapivra	IgG1k	CD11	psoriasis vulgar	2008	2004	NA	CHO	
	bevacizumab	Avastin	IgG1k	VEGF	cáncer colorrectal	2004	2005	2007	CHO	
	natalizumab	Tysabri	IgG4κ	Integrina α4	esclerosis múltiple	2004	2006	2014	célula de mieloma murino	
	tocilizumab	Actemra	IgG1k	IL-6R	enfermedad de Castleman, artritis reumatoide	2010	2009	2005	CHO	
	ranibizumab	Lucentis	IgG1k/Fab	VEGF-A	degeneración macular asociada a la edad	2006	2007	2008	E,CoM	
	oculizumab	Soliris	IgG2Mκ	CS	hemoglobinuria paroxística nocturna	2007	2007	2010	NS0	
	certolizumab pegol	Cimzia	Fab+PEG	TNFα	artritis reumatoide, enfermedad de Crohn grave	2008	2009	2012	E,CoM	
	mogamulizumab	Poteligo	IgG1k	CCR4	leucemia/linfoma de linf. T del adulto, CCR4+	NA	NA	2012	CHO	
	perizumab	Perjeta	IgG1k	HER2	cáncer de mama inoperable o recurrente HER2+	2012	2013	2013	CHO	
	trastuzumab emtansina	Kadcyla	IgG1k (modificada con maitansina)	HER2	cáncer de mama recurrente metastásico HER2+	2013	2013	2013	CHO	
	obinutuzumab	Gazyva	IgG1	CD20	leucemia linfocítica crónica	2013	2014	NA	CHO	
	vedolizumab	Entyvio	IgG1	Integrina α4β7	enfermedad de Crohn	2014	2014	NA	CHO	
	penixolizumab	Koytuda	IgG4κ	PD-1	melanoma	2014	2015	NA	CHO	
	idarucizumab	Praxbind	IgG1 Fab	dabigatrán	neutralización de dabigatrán(Pradaxa(R))	2015	2015	NA	CHO	
	mepolizumab	Nucala	IgG1k	IL-5	asma	2015	2015	2016	CHO	
	sirolimus	Empliciti	IgG1k	SLAMF7	mieloma múltiple	2015	NA	NA	NS0	
	daratumumab	Darzalex	IgG1k	CD38	mieloma múltiple	2015	NA	NA	CHO	
	lirilzumab	Taltz	IgG4	IL-17A	psoriasis vulgar	2016	NA	NA	CHO	
	reslizumab	Cinqair	IgG4κ	IL-5	asma	2016	NA	NA	NS0	
	Anticuerpo humano	adalimumab	Humira	IgG1k	TNFα	artritis reumatoide	2002	2003	2008	CHO
		panitumumab	Vectibix	IgG2κ	EGFR	cáncer colorrectal	2006	2007	2010	CHO
golimumab		Simpsoni	IgG1k	TNFα	artritis reumatoide	2009	2009	2011	Sp 2/0-Ag14	
ustakinumab		Stelera	IgG1k	IL12, IL23-p40	psoriasis	2009	2009	2011	Sp 2/0	
canakinumab		Jans	IgG1k	IL-1β	síndrome periódico asociado a la criopirina	2009	2009	2011	Sp 2/0-Ag14	
ofatumumab		Arzama	IgG1k	CD20	leucemia linfocítica crónica	2009	2010	2013	NS0	
denosumab		Prolia/Xgeva Ranmab	IgG2	RANKL	lesión ósea, osteoporosis	2010	2010	2012	CHO	
ipilimumab		Yervoy	IgG1k	CTLA4	melanoma	2011	2011	2015	CHO	
belimumab		Benlysta	IgG1λ	BLyS	LES	2011	2011	NA	NS0	
raxibacumab		Raxibacumab	IgG1A	B. anthracis tc	antrax por inhalación, antrax pulmonar	2012	NA	NA	célula murina	
ramucicromab		Cyrusza	IgG1	VEGFR2	cáncer gástrico	2014	2014	2015	NS0	
nivolumab		Opdivo	IgG4	PD-1	melanoma maligno	2015	2015	2014	CHO	
secukinumab		Cosentyx	G1k	IL17-A	psoriasis vulgar, psoriasis artropática	2015	2015	2014	CHO	
svovocumab		Rapathra	IgG2	PCSK9	hipercolesterolemia	2015	2015	2015	CHO	
alirocumab		Praluent	IgG1	PCSK9	hipercolesterolemia	2015	2015	NA	CHO	
nectumumab		Portrazza	IgG1k	EGFR	cáncer de pulmón no microcítico	2015	2016	NA	NS0	

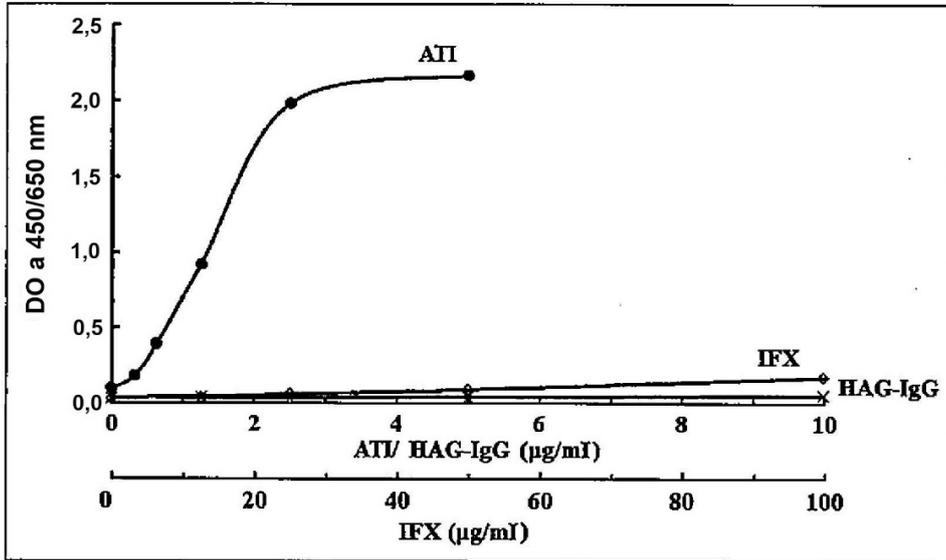
NA: no aprobado

[FIG. 1-B]

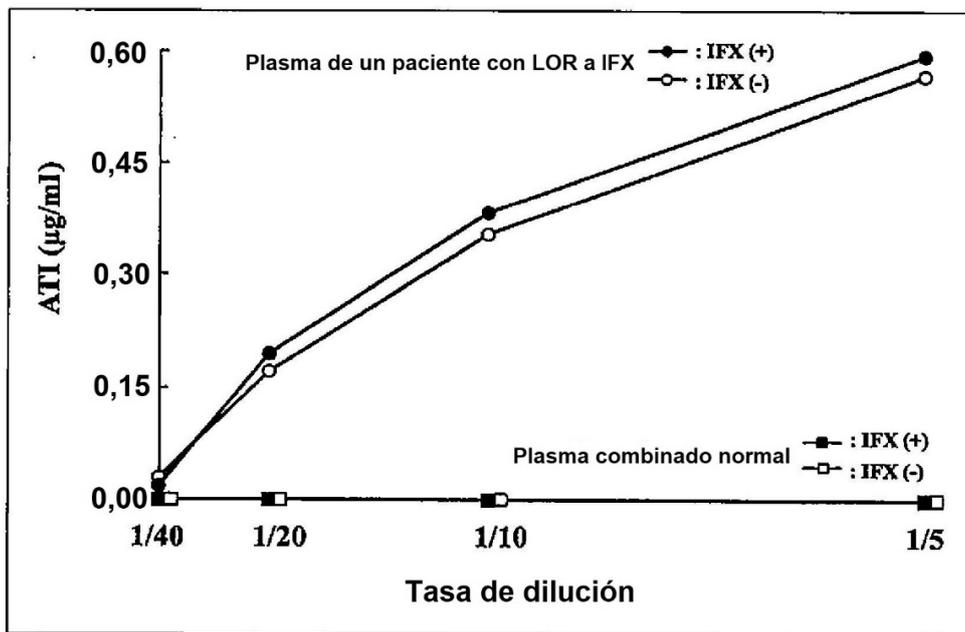
Nombre biológico	Empresa	Tipo	Diana	Indicación(es)	Inmunogenicidad descrita
Prolastina	Talecris biotherapeutics	PD	Inhibidor de la $\alpha 1$ -proteínasa	deficiencia de la $\alpha 1$ -antitripsina	Ninguna descrita
Aralast	Baxter Healthcare	PD	Inhibidor de la $\alpha 1$ -proteínasa	deficiencia de la $\alpha 1$ -antitripsina	Ninguna descrita
Zemaira	Aventis Behring (CSL Behring)	PD	Inhibidor de la $\alpha 1$ -proteínasa	deficiencia de la $\alpha 1$ -antitripsina	Ninguna descrita
Kogenate FS	Bayer (Bayer Schering Pharma)	rHu	Factor VIII	Hemofilia A	15%
ReFacto	Genetics Institute (Wyeth)	rHu	Factor VIII	Hemofilia A	30%
Zyntha	Wyeth (Pfizer)	rHu	Factor VIII	Hemofilia A	2,2% (89)
NovoSeven	NovoNordisk	rHu	Factor FVII	Hemofilia	<1%
Benefix	Wyeth (Pfizer)	rHu	Factor IX	Hemofilia B	3%
ATryn	GTC Biotherapeutics	rHu	Anti-trombina	Tromboembolismo	Ninguna descrita
BabyBIG	California Department of Health Services	PD	Inmunoglobulina botulínica humana intravenosa	Botulismo del lactante	
Beriner	CSL Behring	rHu	Inhibidor de la C1 esterasa	Angioedema	
Cinryze	Lev Pharmaceuticals	rHu	Inhibidor de la C1 esterasa	Angioedema	
Rhophylac	CSL Behring	PD	Inmunoglobulina Rho(D)	ITP	0% (447)
Evithrom	OMRIX Biopharmaceuticals	rHu	Trombina, Tópica	Coagulación	3,3%
Recothrom	ZymoGenetics	rHu	Trombina, Tópica	Coagulación	1,2-1,5%
Wilate	Octapharma	PD	Factor von Willebrand	Coagulación	1,5-3%
Cerezyme	Genzyme	rHu	$\beta$ -glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gacher	15%
Exenatida o Byetta	Amylin Pharmaceuticals/Eli Lilly	R	Péptido tipo glucagón 1	Diabetes tipo II	6%
IntronA	Schering Corp (Bayer Schering Pharma)	rHu	IFN $\alpha$	Leucemia, sarcoma de Kaposi, hepatitis B/C	<3-13%
Betaseron	Bayer Schering Pharma	rHu	IFN $\beta$	Esclerosis múltiple	16,5-25,2%
NovoLog	NovoNordisk	rHu	Análogo de la insulina	Diabetes tipo II	Anticuerpos transitorios
Leukine	Genzyme	rHu	GM-CSF	Prevención de la infección en el cáncer	2,3%
NEUPOGEN (Filgrastim)	Amgen	rHu	G-CSF	Prevención de la infección en el cáncer	3%
Retavase	PDL Biopharma	rHu	TPA	Infarto de miocardio, embolismo pulmonar	0% (2400)
Humatrope	Eli Lilly	rHu	Hormona del crecimiento	Enanismo	1,6%
Adagen	Enzon Pharmaceuticals	Bovino	ADA adenosina desaminasa	Inmunodeficiencia heredada	No descrita (SCID)
Pulmozyme	Genentech (Roche)	rHu	ADNasa I	Fibrosis quística	2-4%
Procrit	Amgen	rHu	EPO	Anemia en la enfermedad renal crónica	
Proleucina	Novartis	rHu	IL-2	Oncología	<1%

Se indican los productos humanos recombinantes (rHu), derivados del plasma (PD) y recombinantes (r). Las empresas que han adquirido una participación mayoritaria en cualquiera de las empresas que realizaron el desarrollo inicial de los biológicos se indican entre paréntesis.

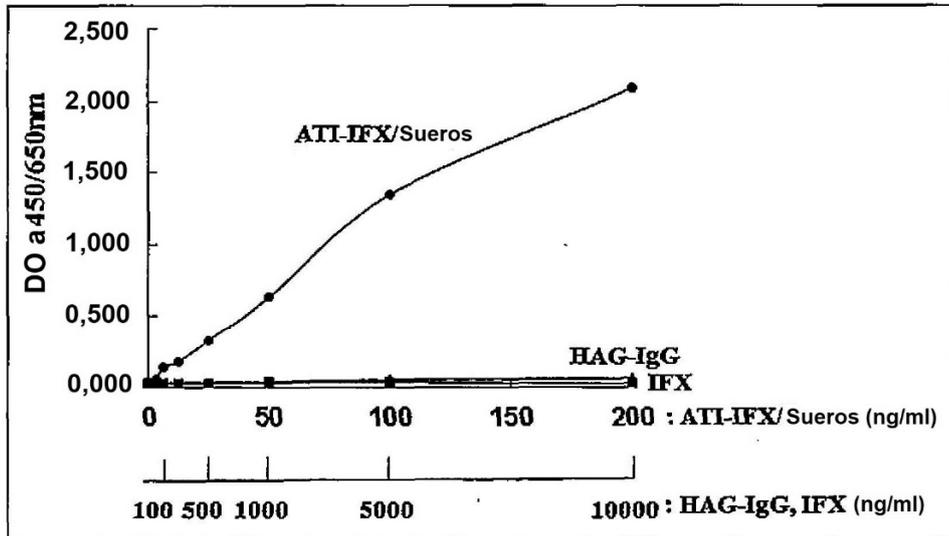
[FIG. 2]



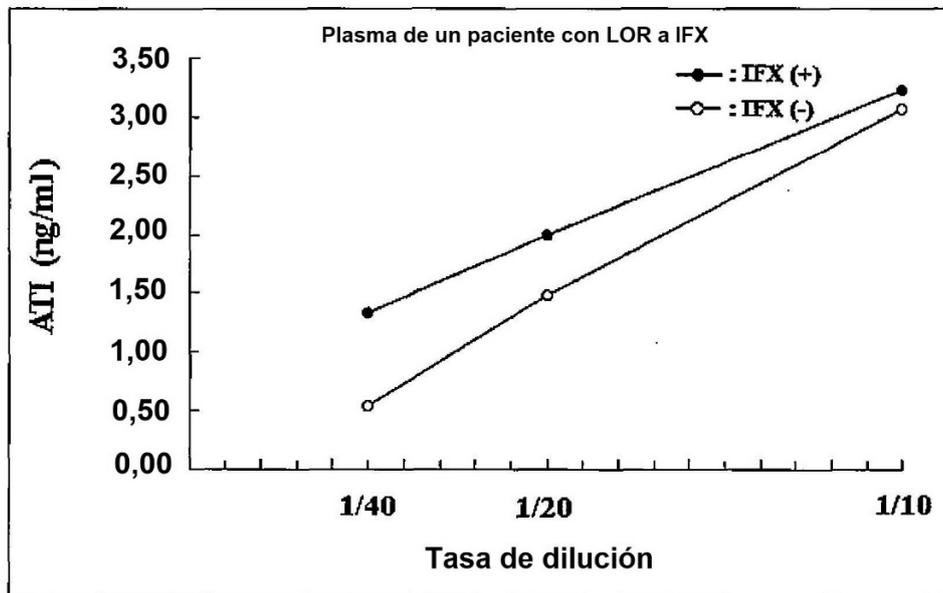
[FIG. 3]



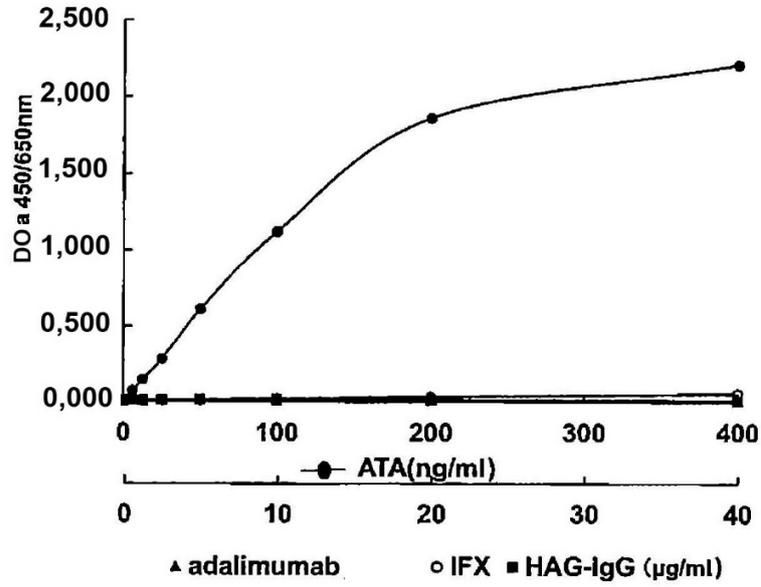
[FIG. 4]



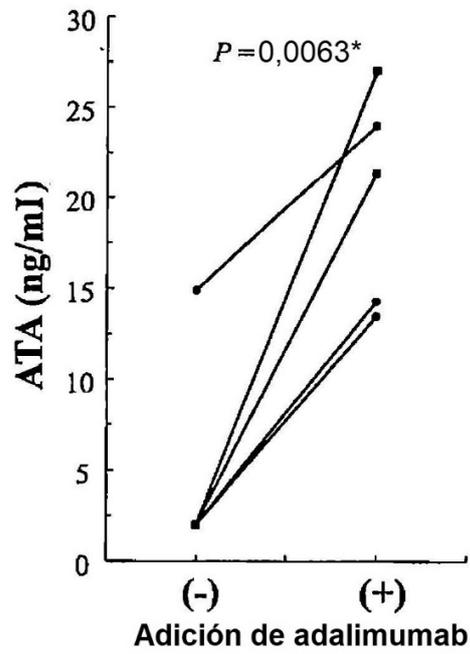
[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]



\*por la prueba t pareada

[FIG. 8]

